L'annuaire du Collège de France
Cours et travaux

111 | 2012
Annuaire du Collège de France 2010-2011

Processus morphogénétiques

Alain Prochiantz

Édition électronique
URL : https://journals.openedition.org/annuaire-cdf/1425
DOI : 10.4000/annuaire-cdf.1425
ISBN : 978-2-7226-0324-0
ISSN : 2109-9227

Éditeur
Collège de France

Édition imprimée
Date de publication : 1 avril 2012
Pagination : 269-291
ISBN : 978-2-7226-0156-7
ISSN : 0069-5580

Référence électronique
Alain Prochiantz, « Processus morphogénétiques », *L'annuaire du Collège de France* [En ligne], 111 | 2012, mis en ligne le 22 novembre 2013, consulté le 22 août 2022. URL : http://journals.openedition.org/annuaire-cdf/1425 ; DOI : https://doi.org/10.4000/annuaire-cdf.1425

Tous droits réservés

Processus morphogénétiques

M. Alain PROCHIANTZ, membre de l'Institut
(Académie des sciences), professeur

RÉGÉNÉRATION ET PLASTICITÉ DANS LE SYSTÈME NERVEUX

Cellules souches, rappels et définitions

Les cellules souches se définissent par leur capacité à donner une autre cellule souche et une cellule plus restreinte dans ses possibilités de différenciation. Ces divisions sont le plus souvent très lentes et il existe un compartiment d'amplification des cellules destinées à une différenciation ultérieure. Le maintien du caractère souche dépend de l'environnement ou de la niche dont les protéines de la matrice extracellulaire et les facteurs de croissance fournissent les éléments d'une reproduction, à l'infini ou presque, de ces cellules. Sur le plan intracellulaire, l'état épigénétique est évidemment important, mais aussi l'expression de protéines anti-âge, en particulier ces enzymes – les télomérases – qui réparent les télomères et empêchent leur raccourcissement qui, à chaque génération, marque le temps passé.

Il existe différents types de cellules souches. Les cellules totipotentes peuvent donner tous les types cellulaires et reformer un organisme entier. Les cellules pluripotentes peuvent donner tous les lignages : c'est le cas des cellules souches embryonnaires. On peut encore réduire la potentialité à des cellules qui vont donner tous les lignages d'un seul tissu, par exemple les cellules souches hématopoïétiques (multipotentes). Au niveau encore inférieur de potentialité sont les cellules souches qui, pour un même tissu, donnent certains types cellulaires seulement. C'est le cas des souches neurales de la zone subventriculaire qui se différencient principalement en astrocytes, oligodendrocytes et interneurones GABAergiques du bulbe olfactif. Enfin, il y a les « derniers de la classe » ou les unipotentes qui ne donnent qu'un type cellulaire, par exemple les cellules souches neurales du gyrus denté de l'hippocampe, seulement capables de donner des cellules des grains.

À l'inverse de ce que pensait August Weismann (1834-1914), la différenciation ne s'accompagne pas d'une perte irréversible d'information génétique. Les neurones ou les fibroblastes ont la même information génétique, mais n'en expriment pas les mêmes segments. Les premières expériences de reprogrammation nucléaire de Kings et Briggs en 1952 ont constitué une des premières réfutations de la théorie

Weismann et un soutien à l'idée avancée par le botanise hollandais Hugo de Vries (1848-1935), re-découvreur au début du XX^e siècle des lois de Mendel (avec Carl Correns et Erisch von Tschermak), que c'est le cytoplasme qui modifie l'expression génétique mais que la potentialité génétique reste entière, et pas seulement dans la lignée germinale comme le proposait Weismann.

Nous savons aujourd'hui que c'est plus compliqué et qu'il faut accepter quelques exceptions à l'idée de totipotence du génome, quand ce ne serait que celle des cellules immunitaires qui synthétisent des anticorps encodés après des recombinaisons génétiques altérant irréversiblement le génome. Plus généralement, l'ADN est le site de multiples réparations, le siège de transpositions, bref la totipotence n'est pas synonyme d'inaltération d'un génome de toute façon physiologiquement instable. Avant d'entrer dans le vif de la neurogenèse adulte, je rappellerai que la plupart des expériences de reprogrammation qui ont donné naissance aux espoirs contemporains de médecine régénérative trouvent leur origine dans cette question de l'altération irréversible ou non des génomes. En effet, seule une inaltération globale peut donner l'espoir de rendre à une cellule différenciée la totipotence d'un œuf et donc d'être utilisée pour la réparation de tout type de tissu.

Neurogenèse adulte, aspects historiques, comparaisons entre espèces

Les premiers travaux qui abordent sérieusement la question de la neurogenèse non-embryonnaire sont signés par Altman et Das [1, 2] en 1965. Dans cet article, les auteurs démontrent clairement une incorporation de thymidine dans le gyrus denté de l'hippocampe avec une diminution nette, avec l'âge, du nombre de cellules marquées. Ils remarquent que, dans l'hippocampe, seule la couche granulaire du gyrus denté est marquée. Les auteurs sont frappés par le fait que les cellules sont marquées mais ne présentent pas de figures de mitoses et en concluent que la division cellulaire se fait au niveau de précurseurs indifférenciés qui se différencient ultérieurement en cellules des grains. Ils s'interrogent aussi sur la nature gliale de ces cellules, pour la réfuter, ce qui n'est pas sans ironie puisque ces précurseurs sont effectivement des cellules gliales.

La même année, les mêmes auteurs proposent, sur la base d'une forte incorporation dans les cellules de la zone subventriculaire (SVZ), que les précurseurs prolifèrent dans la zone ventriculaire puis migrent vers le gyrus denté où elles se différencient en cellules des grains. Cette hypothèse est fausse puisque deux zones de prolifération (au moins) existent, une dans la SVZ et l'autre dans le gyrus denté. Mais l'idée est intéressante du point de vue de la neurogenèse induite par des lésions. Dans ce même article, ils suggèrent que les cellules de la SVZ prolifèrent puis migrent vers le bulbe olfactif où elles se différencient. En revanche, ils ne voient pas d'incorporation dans les cellules mitrales du bulbe olfactif, non plus que dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe ou dans les cellules de Purkinje. D'où la spéculation que les neurones afférents et efférents seraient fixes en nombre mais que la modulation qu'on dirait aujourd'hui épigénétique repose sur le nombre des interneurones qui, lui, serait variable.

Cette histoire de neurogenèse adulte s'est alors endormie avec seulement deux articles importants en 1977 [3] et 1982 [4]. Les travaux de Altman et ses collègues, bien que consacrés à des périodes relativement précoces de la vie adulte et ayant indiqué une baisse de le neurogenèse avec l'âge, avaient été très contestés pour la

raison que les cellules des grains sont difficilement distinguables, par des moyens cytologiques, des cellules gliales. Mais puisque les cellules souches neurales, nous le savons aujourd'hui, sont des astrocytes, cela fait tomber l'argument. Une autre critique était que les coupes étaient relativement épaisses, rendant possible une superposition de deux cellules, une gliale qui prolifère et une neuronale dans le voisinage. C'est un artefact courant aujourd'hui écarté par des technologies optiques adéquates.

L'affaire a pris un coup d'accélérateur à partir de 1983 avec les travaux de l'équipe de Fernando Nottebohm sur les centres de contrôle du chant chez les canaris. Un premier article publié en 1983 démontre la production, migration et différenciation de neurones dans le noyau de contrôle du chant chez le canari adulte [5]. En 1985 et 1988, la même équipe publie deux articles qui confirment l'hypothèse d'une neurogenèse adulte des interneurones mais aussi des neurones de projection [6, 7]. Les canaries, en effet, développent leur chant par imitation du chant des autres canaris. Le *High Vocal center* (HVc) dans le cerveau antérieur de la bête joue un rôle important dans cet apprentissage. Le HVc apparaît environ 30 jours après la naissance et n'atteint sa taille normale que vers 210 jours. Le développement du chant est très lent, puisque initié à P40, et le chant se stabilise vers P240. Les neurones HVc envoient des projections sur deux noyaux le RA (*robustus archistriatalis*) et l'area X.

L'apprentissage du chant chez le canari se faisant entre P40 et P240, les auteurs proposent que ces neurones de projection soient impliqués dans l'apprentissage des séquences motrices nécessaires. Les canaris mâles atteignent la maturité sexuelle à P240 quand leur répertoire de son est stéréotypé. Les nouvelles cellules acquises à ce stade pourraient servir à des modifications qui se produisent plus tardivement quand le chant redevient instable et que de nouvelles syllabes sont apprises (*open-ended learner*). Ces naissances de neurones, tardives chez le canari, ne sont pas observées chez les pinsons dont le chant n'évolue plus chez l'adulte (*age-limited learner*). Mais il n'y a pas que les centres du chant qui donnent lieu à une neurogenèse adulte, comme le démontre le recrutement saisonnier de neurones par l'hippocampe des passereaux à cape noire [8]. L'addition de neurones au cours de la vie adulte correspond soit à une augmentation de taille de la structure impliquée, soit à un remplacement de neurones qui disparaissent. Ce « renouvellement » pourrait être particulièrement avantageux pour les oiseaux dans la mesure où leur mode de vie impose une contrainte relativement au poids de leur cerveau. Par conséquent, une augmentation de la taille de ce cerveau en amont immédiat de la nécessité physiologique constituerait un clair avantage évolutif.

Barnea et Nottebohm ont testé cette hypothèse sur un oiseau qui stocke de la nourriture de façon saisonnière. Les passereaux ont un régime qui change au début de l'automne, passant des insectes aux graines. À cette période, un changement de comportement prend aussi place, consistant en la fin de la défense de son territoire (fin de la période de compétition sexuelle) et en l'adoption de comportements collectifs, chaque horde d'oiseau ayant une surface d'environ 10 hectares. En même temps, dans nos régions, les arbres perdent leur feuillage et il peut y avoir des chutes de neige. Bref, le paysage change en même temps que les habitudes alimentaires et les comportements sociaux. Dans cette période, les passereaux commencent à cacher un pourcentage des graines qu'ils trouvent et dispersent ces graines entre différentes caches, ce qui implique une mémorisation spatiale des caches qui peut durer de quelques heures à quelques semaines. D'où l'idée, vérifiée, que l'automne doit s'accompagner d'une augmentation de la neurogenèse dans l'hippocampe, structure impliquée dans la mémoire spatiale.

L'étude montre que les cellules générées sont dans une bande proche de la zone ventriculaire et que la densité de neurones marqués (en prolifération) est saisonnière, avec un pic en octobre, sans modification du nombre total de neurones. Ces neurones disparaissent après 6 à 7 semaines. Cette neurogenèse saisonnière est spécifique à l'hippocampe. Comparant des pinsons sauvages à des pinsons captifs, les auteurs observent que le pic d'octobre est deux fois moins marqué chez ceux-ci, ce qui renforce l'hypothèse de la mémoire des caches.

Controverse sur la neurogenèse adulte

Pour en venir à l'aspect « controverse », je discuterai un article de Pasco Rakic de 1985 : « Limits of Neurogenesis in Primates » [9]. Le résumé dit tout : « les seules cellules qui prolifèrent chez le primate adulte sont des cellules gliales, en aucun cas des neurones ». Rakic travaille sur le singe rhésus de 6 mois à 1 an, auquel il injecte le traceur radioactif (la thymidine tritiée) et qu'il tue entre 3 jours et 6 ans après les injections. Il regarde toutes les structures les plus importantes dont : les cortex moteur, visuel et associatif, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le thalamus, la rétine, les ganglions de la base, le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière et conclut : « Not a single heavily labeled cell with the morphological characteristics of a neurons was observed in the brain of any adult animal. » Pour ce qui est du gyrus denté et de l'hippocampe, « none of the radiolabeled cells in the mature dentate gyrus had neuronal properties ».

Rakic s'interroge alors sur la signification biologique de l'absence de neurogenèse adulte chez les primates et avance l'idée que ce phénomène est lié aux interconnexions synaptiques, qui ne permettent pas l'intégration de nouveaux neurones et la croissance des axones sur de longues distances. Il remarque, à juste titre, que la neurogenèse adulte est plus marquée chez les animaux qui ont gardé des capacités considérables de régénération, comme les poissons, les amphibiens, ou les oiseaux. « One can speculate that a prolonged period of interaction with the environment, as pronounced as it is in all primates, especially humans, requires a stable set of neurons to retain acquired experiences in the pattern of their synaptic connectivity ».

La controverse est discutée par Elizabeth Gould en 2007 [10]. Contrairement à Rakic, cette chercheuse avait produit la démonstration (controversée) d'une neurogenèse adulte chez les primates, dont le macaque. Nous verrons dans un instant comment cette démonstration d'une neurogenèse adulte fut rapidement étendue à l'humain (*dentate gyrus*) ce qui donna un « *boost* » significatif au domaine. On peut dire qu'à ce jour le fait de la neurogenèe adulte, y compris chez les primates dont *sapiens*, est généralement accepté pour les deux régions que sont le gyrus denté et la SVZ. La polémique se poursuit cependant sur la question du cortex.

Le débat s'est aujourd'hui déplacé vers les régions neurogéniques. S'il est acquis que la SVZ et le gyrus denté de l'hippocampe sont des niches, la démonstration finale de la présence d'autres niches, dans le cortex en particulier, se fait toujours attendre. Les preuves d'une telle neurogenèse dans les conditions normales sont très discutées, même si on accepte plus facilement l'idée d'une neurogenèse réactive induite par des lésions du cortex ou de la moelle épinière. Dans d'autres modèles, les cellules en apoptose envoient un signal de neurogenèse et créent les conditions de la niche. La possibilité qu'une apoptose synchrone et importante dans le cortex puisse créer les conditions de la neurogenèse ne peut donc pas être éliminée.

Mais avant d'arriver à cette possible neurogenèse réactive, il faut établir la réalité de la neurogenèse chez l'humain dans les régions neurogéniques reconnues par tous. Un premier papier, publié en 1998, marque un tournant dans l'histoire, somme toute récente, des cellules souches neurales. Le truc utilisé par Gage et collaborateurs [11] fut de récupérer du tissu cérébral humain post-mortem, en provenance de patients cancéreux ayant reçu du BrdU en intraveineux, à des fins de diagnostic. Partant du fait bien établi de la neurogenèse dans le gyrus denté et dans la SVZ, Eriksson et ses collègues récupèrent du tissus de ces deux régions chez cinq patients décédés ayant reçu le BrdU et démontrent l'existence d'une neurogenèse dans l'hippocampe humain adulte.

Neurogenèse réactive

Revenons à l'hypothèse d'une neurogenèse corticale induite par des lésions. J'utiliserai trois articles publiés en 2000, 2004 et 2009. Le premier papier [12] explore l'idée que l'apoptose induite de façon synchrone envoie un signal de neurogenèse. Une apoptose synchrone est induite dans les neurones cortico-thalamiques de la couche VI du cortex. Ce sont des neurones de projection, et donc pas des interneurones. Cette région du néocortex antérieur est proche de la zone subventriculaire, riche en cellules souches neurales. La question posée ici est principalement celle de la capacité du cortex à attirer des cellules souches de la SVZ et de la façon dont ces cellules se différencient en fonction de l'endroit où elles aboutissent. De nouvelles cellules sont observées entre 2 et 28 semaines après la lésion. Ce sont des neurones, et parmi eux, des neurones pyramidaux. Sur la base d'un marquage à la double cortine (Dcx), on infère qu'ils sont en migration et viennent de la SVZ *via* le corps calleux.

Le deuxième article [13] du même groupe est très proche, conceptuellement, mais les projections sont beaucoup plus longues et la couche du cortex plus éloignée de la SVZ. Il s'agit en effet des neurones qui partent du cortex moteur, dits pour cette raison « neurones moteurs corticaux-spinaux » (NMCS), qui contrôlent les mouvements moteurs volontaires. Les images des nouveaux neurones (apparus après lésion synchrone et massive) suggèrent que ces neurones migrent depuis la SVZ, à travers le corps calleux, et la couche VI, vers la couche V du cortex. Ces neurones se trouvent exclusivement dans les régions de la couche V et certains d'entre eux ont une morphologie de cellules pyramidales. Le plus grand nombre de ces cellules est vu deux semaines après l'induction, mais il en reste un nombre significatif plusieurs semaines (56) plus tard.

Nous sommes encore face à l'alternative SVZ ou pas SVZ (pour ce qui est de l'origine des cellules). Si oui, alors les progéniteurs peuvent migrer sur une assez longue distance (ils vont dans la couche V et plus seulement dans la couche VI du cortex). Par ailleurs, ils font des motoneurones et non plus des neurones cortico-thalamiques comme dans l'article précédent, ce qui veut dire que la niche donne une information très précise quant au programme de différenciation. Si tel est le cas, il faut s'interroger sur les facteurs qui attirent les cellules souches vers la niche et sur ceux qui donnent à ces cellules des indications de position et de lignage.

Un troisième article [14] utilise un mode de lésion différent du cortex visuel. Ces lésions présentent une zone centrale coagulée et une zone périphérique « de pénombre ». Dans une première partie de leur article, les auteurs redémontrent ce

que nous savons déjà, à savoir que la mise en culture de cellules isolées de la SVZ ou de gyrus denté permet le développement de clones – neurosphères – riches en cellules souches neurales, mais que rien de tel ne se produit avec du cortex. En revanche, la situation change si on induit une lésion dans le cortex visuel. Ces neurosphères peuvent donner des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones. Ces expériences ont été menées avec les mêmes résultats chez des ratons (P21) et des rats adultes (5 mois).

La différence avec les expériences précédentes réside dans le mode de lésion et aussi dans le fait qu'on regarde maintenant au niveau de la couche I, c'est-à-dire très en surface, loin de la SVZ, ce qui rend improbable la migration de cellules depuis la SVZ et suggère l'existence d'une autre source de cellules souches neurales. Les auteurs se réfèrent à un article [15] qui décrit au cours du développement une autre zone neurogénique, laquelle n'est autre que la couche I – au cours de l'embryogenèse, évidemment, mais il resterait à voir si les fonctions neurogéniques de cette couche ne sont pas réactivées chez l'adulte après lésion.

Les lésions discutées ont été provoquées par des protocoles pas vraiment naturels. À l'inverse, deux articles assez récents suggèrent des possibilités d'amplifier la régénération après un infarctus cérébral. Le premier [16] me permet d'introduire la possibilité d'un rôle des molécules du complément, facteurs importants de l'immunité innée. Le système du complément est classiquement impliqué dans l'inflammation, l'opsonisation (la phagocytose des cellules « anormales » ou des débris cellulaires par les macrophages qui reconnaissent des antigènes spécifiques de ces cellules) et la cytolyse des éléments étrangers. Il s'agit d'un système ancien de défense des organismes, présent avant l'invention de la réponse immunitaire acquise classique liée à la sécrétion d'anticorps par les cellules B ou à l'action des cellules T. De nombreuses cellules produisent les protéines du complément. Une expression modérée de ce système a une action physiologique, en particulier au cours de la régénération et pour le nettoyage qui accompagne la mort continue et physiologique des cellules, ainsi que l'élimination des synapses au cours du développement.

Dans le système nerveux central, les astrocytes, les microglies (macrophages cérébraux) et les neurones sont capables d'exprimer la plupart des molécules du système du complément. Nous nous concentrerons sur deux composants du complexe du complément, les composants 3 et 5 (C3 et C5) qui, suite à l'activation du système, génèrent les polypeptides C3a et C5a. Ces petits polypeptides se fixent à leurs récepteurs C3aR et C5aR, membres de la famille des rhodopsines, sous-famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires (cours de 2008). C3aR et C5aR sont normalement exprimés dans le SNC, tout particulièrement par les neurones du cortex et de l'hippocampe.

Régénération réactive, neuroimmunologie

Récemment, il été démontré que le système du complément participe à la régénération tissulaire. Chez les amphibiens, l'expression de C3 a été détectée dans les membres en régénération mais pas au cours de leur développement normal. C3 et C5 sont exprimés dans les membres et la lentille de l'œil du triton au cours de leur régénération (cours 2009). Chez les mammifères, C3a et C5a sont indispensables à la prolifération des hépatocytes et à la régénération du foie. Finalement, C3a induit la migration (*homing*) et la rétention des cellules souches hématopoïétique

dans la moelle osseuse. Rahpeymai et ses collègues [16] se sont intéressés à l'activité possible du système du complément dans la neurogenèse adulte chez les mammifères, la neurogenèse normale et celle qui suit une ischémie cérébrale.

C3aR et C5aR sont exprimés par les cellules souches neurales (NSC) et les progéniteurs neuronaux en culture, et par le compartiment d'amplification des cellules souches de la SVZ *in vivo*, caractérisées par Olig2, un facteur de transcription de la famille des bHLH. Ces deux récepteurs sont aussi exprimés par les jeunes neurones en migration qui sont marqués par la double-cortin, une protéine associée au cytosquelette des cellules nerveuses et régulant leur motilité. En revanche, pas de double marquage avec la GFAP ce qui exclut les astrocytes et les progéniteurs neuraux. Le rôle de C3aR (pris ici comme exemple) a été étudié grâce à des souris dont ce gène a été rendu invalide (ces souris ne peuvent générer C5a de toute façon) et à l'existence d'un antagoniste spécifique de ce récepteur (SB290157). La perte de l'activité C3aR diminue de 33 % le nombre de nouveaux neurones dans le bulbe olfactif et le gyrus denté mais ne modifie pas le nombre de cellule souches ou du compartiment d'amplification. C'est donc au niveau de la différenciation et de la migration de ces cellules que les choses se jouent.

En utilisant les souris invalidées pour C3 (C3-/-), les auteurs ont induit une ischémie par occlusion de l'artère cérébrale médiane. Ce protocole conduit à un infarctus très large du cortex cérébral et du striatum, suivi d'une prolifération et d'une migration des cellules de la SVZ vers la zone infarctée et de leur différenciation en neurones. Le résultat démontre une nette réduction des jeunes neurones chez le mutant. Finalement, la présence de jeunes progéniteurs dans la zone de l'infarctus et dans la pénombre a été analysée et les progéniteurs sont plus nombreux chez les souris sauvages que chez les souris mutées, et ce, quelle que soit l'origine (migration ou neurogenèse locale) de ces cellules. Enfin, C3 a un rôle positif, non seulement sur la neurogenèse normale, mais aussi sur celle qui accompagne la réparation qui suit un infarctus cérébral.

L'article suivant [17] démontre que des facteurs exogènes peuvent stimuler la régénération dans un système d'ischémie plus léger consistant à retirer les vaisseaux de la couche superficielle (pia) du cortex. Cette opération induit un infarctus local (cortex moteur) et la formation d'une cavité qui s'étend jusqu'au corps calleux. On sait que l'EGF ou TGF-alpha, comme l'EPO, ont une action sur la neurogenèse. L'EGF stimule la prolifération des cellules de la SVZ puis leur migration et l'EPO a une action sur la différenciation des neurones et la formation de nouveaux vaisseaux. Ces infusions ont été faites dans le ventricule latéral contralatéral conduisant à une réparation du tissu, mais sans réorganisation en couches corticales, donc sans réelle morphogenèse.

Ces nouveaux neurones, dont il semble qu'ils aient migré depuis la SVZ, permettent une récupération fonctionnelle importante. Parmi les tests de récupération motrice, je ne décrirai que le test d'usage asymétrique de la patte pour explorer une surface verticale et le « skilled reaching » qui consiste à utiliser sa patte pour aller déloger une pastille de nourriture. Dans le premier, les rats utilisent normalement les deux pattes. Après la lésion, ils utilisent peu la patte contralérale à la lésion (les commandes motrices sont croisées). Pour ces deux tests, la récupération est presque totale si les deux facteurs (EGF et EPO) ont été infusés. Les traitements ont été initiés le jour du *stroke* ou 3, 7 et 14 jours après. Là, les résultats diffèrent selon les tests. Par exemple, on observe la récupération après le début du traitement à + 14 pour le test de l'asymétrie mais pas pour le test plus fin. En revanche, un début

de traitement 3 jours après l'ischémie permet une récupération complète, quel que soit le test utilisé. Il en ressort que l'induction rapide de la neurogenèse après un accident peut avoir, chez le rat, un effet positif sur la récupération.

Revenons à la question de l'origine des nouveaux neurones. Ce même article répond à la question en utilisant un marquage des cellules de la SVZ par un rétrovirus porteur du gène de la ß-galactosidase. Ce virus infusé dans le ventricule latéral ne peut infecter que les cellules souches de la SVZ. Si les cellules qui envahissent le parenchyme sont bleues, alors on peut dire qu'elles viennent de la SVZ. Ce qui est clair est qu'après quatre jours toutes les cellules marquées sont dans la SVZ, mais qu'à onze jours, on en voit moins dans la SVZ et plus en migration, voire au site même de la lésion. Beaucoup de cellules viennent donc de la SVZ (mais cela élimine-t-il une contribution locale ?)

Un point important concerne la nature des cellules nouvellement formées. Les cellules de la SVZ sont normalement destinées à former des interneurones GABAergiques du bulbe olfactif. Or la récupération fonctionnelle nécessite des neurones pyramidaux et, dans plusieurs modèles de lésion, on observe des cellules de morphologie pyramidale marquées par le BrdU projetant sur le thalamus ou même la moelle épinière. D'où la question de savoir si les cellules de la SVZ peuvent donner naissance à des cellules autres que des interneurones GABA, dont des cellules pyramidales. De ce point de vue, l'article de Nakatomi et collègues [18] est intéressant. Les auteurs utilisent un modèle d'ischémie transitoire qui induit la mort des neurones pyramidaux de la partie dorsale de l'hippocampe (CA1), avec une perte quasi totale 17 jours après et une récupération partielle après 28 jours. Cette récupération peut être considérablement augmentée par l'infusion de FGF-2 et d'EGF dans le ventricule latéral dans les 2 à 5 jours qui suivent l'ischémie.

Cette récupération, de 40 % environ, des neurones détruits demande de la division cellulaire et les neurones expriment SCIP, un facteur de transcription spécifique des CA1 (des neurones pyramidaux). Les marquages au BrdU montrent que ces neurones sont nouvellement générés, pour une grande part d'entre eux. Il est important de constater la très forte augmentation de cellules exprimant les marqueurs neuronaux, certes dans la zone subgranulaire du gyrus denté, mais surtout dans la zone périventriculaire postérieure, région normalement peu neurogénique. Ce qui amène à reposer la question de l'origine des nouveaux neurones de la région CA1. Pour constater que nombre de ces cellules sont générées dans cette zone postérieure. Enfin, ces cellules qui ont le phénotype approprié et migrent dans des régions elles aussi appropriées présentent une réintégration morphologique et permettent une récupération électrophysiologique et comportementale.

Pression partielle d'oxygène (pO2) et neurogenèse

Faisant l'impasse ici sur toute une part du cours dédiée à la trans-différenciation, je reviens sur ce qui distingue une région corticale neurogénique d'une région non-neurogénique. Pour être neurogénique il faut la fonction « niche » plus des cellules souches. Ensuite se pose la question de la diversité des lignages que cette « nichitude » permet. Enfin, se pose la question de l'origine des cellules souches : endogènes ou importées. Pour le développement ou la physiologie, c'est relativement simple, mais pour la régénération ça se complique du fait que l'environnement physiologique peut être modifié par la pathologie ou par la lésion.

Plutôt que de me lancer dans la description de tous les facteurs qui confèrent le caractère « niche », je vais développer l'aspect pO2 qui attire aujourd'hui l'attention de nombre d'investigateurs. Puis je parlerai de la migration et assez peu de la différenciation (un peu quand même), puisque c'est un point que nous avons déjà examiné. Nous savons que pour passer d'une cellule souche à un type cellulaire différencié, il faut faire défiler l'algorithme de facteurs de croissance et de facteurs de transcription identifiés, le plus souvent, par les études de biologie du développement. Je vais emprunter à Mohyeldin et collègues [19].

Si les pionniers de la culture cellulaire ont porté un soin extrême à définir la composition des milieux de culture en nutriments et à contrôler le pH, la concentration en oxygène pO2 (pression partielle de ce gaz) n'a pas attiré le même type d'attention. On estimait que celle de l'air ambiant était « naturellement » bonne. En fait, quand on mesure ces pressions dans l'embryon en développement, on observe qu'elles sont beaucoup plus basses qu'anticipé et surtout éminemment variables selon les tissus et les situations physiologiques. Il est particulièrement important de constater que la pO2 est généralement faible dans les niches qui abritent des cellules souches.

Les tissus adultes déclinent une grande variété de pO2, elles aussi, comme dans l'embryon, très inférieures au 21 % de l'air inhalé. La pO2 décline dès le passage des poumons et, le temps que l'oxygène arrive aux tissus, elle affiche des valeurs de 2 à 9 %. Une hypothèse est que la basse pO2 des niches minimise le métabolisme aérobique et le stress oxydatif qui l'accompagne avec son cortège de peroxydation des lipides, de cassures de l'ADN, etc. Le métabolisme aérobique et la production d'ATP s'accompagnent en effet de la fabrication de superoxides O2- qui sont transformés en H2O2 dans la mitochondrie. H2O2 diffuse vers le cytoplasme où il est transformé en H2O par la glutathion peroxydase et les catalases. Les protéinés de découplage « uncoupling proteins » (UCP), peuvent aussi faire entrer les ions H+ dans la mitochondrie, réduisant ainsi le potentiel de membrane et la production d'ATP et d'O2-. Mais si les systèmes de protection ne sont pas suffisant, alors H2O2 est oxydé par les métaux Fe2+ ou Cu+ conduisant à la production de radicaux OH- qui oxydent les lipides, les protéines et le DNA, avec des dommages importants au niveau cellulaire. Du fait qu'il produit en moyenne dix fois plus d'ATP par gramme de tissu que les autres organes, le cerveau est donc soumis à un risque important de stress oxydatif. Par ailleurs, l'hypoxie active des cascades de signalisation/transcription qui convergent souvent sur Oct4 et Notch, deux facteurs très importants pour empêcher la différenciation et pour conserver aux cellules leur caractère « souche ». Oct4 est un des 4 gènes du cocktail iPS (avec Klf4, cMyc et Sox2) et Notch est un récepteur transmembranaire qui, quand il est activé par son ligand, voit son domaine intracellulaire passer dans le noyau et activer un certain nombre de gènes qui maintiennent la cellule dans son état indifférencié, ou souche.

Retenons à ce stade que le développement de l'embryon est fortement contrôlé par les gradients de pO2 et précisons que la distance de diffusion de l'oxygène est de 150 µm, soit de 10 à 20 diamètres cellulaires. D'une façon générale, l'hypoxie active les *Hypoxia Inducible Factors* (HIFs), des facteurs de transcription de la famille des bHLH. Les sous-unités alpha « stabilisées par une faible pO2 » s'associent à la sous-unité HIF-ß avant que le complexe ne soit transporté au noyau grâce à ce transporteur. Dans le noyau, HIF régule la transcription de gènes importants (homéostasie de l'oxygène, métabolisme du glucose, angiogenèse, érythropoïèse, métabolisme du fer, etc.). Constatons pour la moelle osseuse et le

cerveau la similarité des régulations et l'importance de la distance qui sépare les cellules des vaisseaux, donc du gradient de pO2. Dans ces deux systèmes, on constate un gradient de 1 à 7 % entre l'épendyme (ou les ostéoblastes) et le vaisseau sanguin. Les cellules souches, pour l'essentiel quiescentes, sont dans la région de basse pO2 et cette pression augmente progressivement alors qu'on se rapproche du vaisseau et qu'on rencontre les cellules en cours de prolifération ou de différenciation.

Pour se concentrer sur le cerveau, la pO2 varie de 0,55% dans le mésencéphale à 8 % à la surface du cerveau. Il n'est donc pas impossible que, en plus des facteurs « niche » classiques, la pO2 joue un rôle régulateur important. Je rappelle que l'ischémie est de nature à baisser localement la pO2 et à favoriser l'établissement d'un caractère « niche » transitoire au niveau de la zone de l'infarctus. Transitoire parce que des cellules souches présentes dans les zones hypoxiques, par exemple greffées dans ces zones, se mettent, sous le contrôle de HIF, à exprimer et sécréter du VEGF qui stimule la revascularisation et maintient la survie des cellules avoisinantes présentes dans la zone de pénombre. Nous avons donc là un système complexe dans lequel la pO2 et les autres facteurs interagissent pour réguler la quiescence, mais aussi la prolifération, migration et différenciation des cellules qui participent à la protection, mais aussi à la reconstruction du tissu.

Je reviens à Notch1 en m'appuyant sur deux articles. Le premier [20] démontre que Notch1 est nécessaire au maintien du réservoir de cellules souches dans le gyrus denté. Je rappelle le modèle des NSC dans cette structure avec le compartiment de cellules souches qui expriment la nestin, le compartiment d'amplification et la maturation des neuroblastes qui expriment Dcx, migrent et s'intègrent dans la circuiterie hippocampique. Notch 1 joue un rôle dans le renouvellement des cellules souches et réprime la sortie du cycle cellulaire et la différenciation de ces cellules en neuroblastes, puis en neurones. Notch1 est important pour la neurogenèse adulte dans la SGZ, la neurogenèse basale et celle stimulée par l'activité physique. Parmi les différentes situations qui peuvent simuler la neurogenèse adulte figurent les activités physiques, dont la course. Les auteurs ont produit une souris exprimant Cre dans le locus nestin et porteuse du gène Notch1 floxé, ce qui permet d'induire la recombinaison (et l'inactivation de Notch1) par le Tamoxifen. Par ailleurs, l'introduction de YFP dans le circuit de recombinaison permet de visualiser les cellules porteuses du gène recombiné, n'exprimant plus Notch1.

L'expérience démontre que ces cellules sont moins nombreuses 60 jours après la délétion, mais pas avant. Ces cellules sont toutes des neurones, ce qui confirme qu'il s'agit bien, essentiellement, de neurogenèse. Afin de déterminer le site d'activité de Notch1, on peut utiliser des marqueurs qui différencient les cellules souches, des neuroblastes en prolifération et des neurones immatures post-mitotiques. Très clairement, le décrochage se fait initialement au niveau des cellules souches et du compartiment d'amplification, et plus tardivement au niveau des neuroblastes ou des neurones post-mitotiques immatures ou matures. La seconde partie de l'article est consacrée à la question des bienfaits du sport. L'activité physique stimule la neurogenèse dans l'hippocampe et agit principalement au niveau du compartiment d'amplification et des neuroblastes. Trente jours après la recombinaison, les souris ont eu accès à une roue et ce, pendant 30 jours. La mesure de l'activité physique ne montre aucun effet de la perte de Notch1 sur l'esprit sportif des souris. En fait, l'activité physique augmente le nombre de cellules de la SGZ (neurones matures) aussi chez les mutants.

Notch1 est donc essentiellement important pour maintenir le réservoir de cellules souches. Pour ce qui est de l'activité physique, on peut proposer qu'elle ne dépend pas de Notch1 mais de nombreux autres facteurs de la niche, particulièrement actifs aux stades tardifs : endocannabinoïdes, ß-endorphines, BDNF, VEGF. Ces données ont plusieurs conséquences. L'une est que l'activité physique est de nature à compenser une déficience génétique. Bien entendu, il faudrait poursuivre les analyses dans le temps et aussi par d'autres critères (physiologiques en particulier), mais c'est un aspect amusant de ce travail. Par ailleurs, cela place Notch au cœur d'une fonction cérébrale adulte importante (la neurogenèse), ce qui peut amener à une certaine prudence dans les traitements qui reposent (cancer ou Alzheimer) sur une inhibition de Notch ou de la secrétase qui clive à la fois le précurseur de la protéine amyloïde et Notch et contribue ainsi à favoriser leur activité transcriptionnelle.

Macrophages cérébraux ou encore microglies

Les microglies comptent pour 5 à 10 % de cellules cérébrales. Au cours du développement, elles participent à la phagocytose de cellules en apoptose et au « pruning » des arborisations. Chez l'adulte, elles présentent les antigènes, conformément à leur identité macrophagique, ce qui signifie un rôle dans la défense au double titre de l'immunité innée et de la présentation d'antigènes (immunité acquise). Mais leur fonction va bien au-delà, puisqu'elles sont régulatrices de la neurogenèse et partenaires à part entière de la physiologie nerveuse. Les microglies ont été découvertes autour des années 1920 par Pio del Rio Hortega (1882-1945), un élève de Ramon y Cajal. L'article de Parkhurst et collègues [21] donne un aperçu de l'importance de ces cellules. Le SNC des mammifères est composé de neurones, de glies et d'éléments vasculaires, les neurones ne participant au cerveau qu'à hauteur de 10 %. Parmi les glies, les microglies ont un statut spécial car elles dérivent du mésoderme, ayant migré depuis la moelle osseuse pendant le développement embryonnaire avant la fermeture de la barrière hémato-encéphalique. On ne peut exclure, comme pour les lymphocytes qui patrouillent dans le cerveau, un passage chez l'adulte, en particulier dans des situations pathologiques (comme une ischémie), mais aussi en temps normal.

Dans les conditions normales, les microglies présentent des prolongements branchés en permanente motilité capables de migrer vers les sites de lésion dans le SNC. Les microglies ramifiées, malgré leurs mouvements, ne sont pas dans un état d'activation. L'activation, le plus souvent associée à un état inflammatoire, se traduit par l'acquisition d'une morphologie amiboïde associée à une migration importante. Ce passage d'un état « quiescent » à un état « activé » est provoqué par des stimulus variés (bactérie, hypoxie, lésion, etc.) et implique des récepteurs spécifiques dont les récepteurs purinergique (P1, P2X, P2Y) et les *Toll-Like Receptors* (ou TLRs). Les récepteurs purinergiques sont activés par les purines, c'est-à-dire par l'ATP et le GTP (l'UTP en fait) ou leurs métabolites, comme l'AMP et l'Adénosine. Ils sont impliqués dans la physiologie de ces cellules, y compris dans leur prolifération, leur migration, leur activité nociceptive, la libération d'interleukine1ß en réponse au LPS ou au ßA4 (le peptide dérivé du précurseur de la protéine amyloïde, à l'origine des plaques qui signent les démences d'Alzheimer).

Les TLRs, exprimés par un grand nombre de cellules de l'immunité innée, reconnaissent toutes sortes de ligands qui signalent un danger, par exemple les produits

d'une bactérie pathogène, ou d'un champignon, ou des antigènes viraux. À la périphérie, l'activation des TLRs entraîne une forte réponse inflammatoire, importante pour réagir à l'agression, mais dangereuse (maladies auto-immunes, inflammation chronique). Chez la souris, les TLRs 1-9 sont exprimés par les microglies. Ils reconnaissent des ligands mais aussi des signaux spécifiques du CNS. C'est le cas du TLR2 qui reconnaît le ßA4 et aussi des ligands libérés par l'ischémie. Un autre système de signalisation est celui du TNF-alpha. Outre son activité associée à l'inflammation, le TNF-alpha inhibe la croissance et la différenciation des progéniteurs d'oligodendrocytes en culture et pourrait avoir un effet direct sur la transduction synaptique. Secrété par les microglies, il peut jouer un rôle protecteur des neurones dans les cas d'ischémie focale et d'exposition au peptide amyloïde Aß. En conclusion, les microglies constituent une population cellulaire hautement dynamique avec des fonctions « normales » et d'autres associées à des situations pathologiques.

En 2002, Greer et Capecchi [22] rapportent un comportement étrange des souris invalidées pour le gène de développement à homéodomaine *Hoxb8*. Il s'agit ici de « grooming » ou de toilettage qui, s'il devient excessif, signe un trouble obsessionnel compulsif (TOC). Le « grooming » est un comportement inné présent chez toutes les espèces. Le soin apporté à sa propre personne, entre périodes de repos et activité, est un comportement normal. Le déroulement de cette activité suit une progression stéréotypée. La tête est toilettée en premier, suivie du tronc, des régions anales et génitales, puis de la queue. L'analyse de ce comportement chez les rongeurs suggère que ce pattern est commandé par le CNS. Les TOC chez l'humain sont aussi caractérisés par un comportement excessif de nettoyage, en particulier de toilettage. Cette maladie a une prévalence de 1,9 à 2,5 % mais les gènes impliqués ne sont pas connus. Dans cet article il est rapporté que des souris invalidées pour *Hoxb8* ont un comportement de toilettage excessif qui conduit à l'arrachement de poils et à des blessures importantes. Point capital : d'une façon similaire à tous les genes *Hox*, *Hoxb8* n'est pas exprimé par les cellules des régions antérieures du système nerveux central (CNS). D'où la surprise de le trouver exprimé dans de nombreuses régions cérébrales dont le bulbe olfactif, les ganglions de la base, l'hippocampe et le cortex.

Curieusement, cet article ne discute pas de la question de l'expression d'un gène *Hox* dans le CNS, mise sur le compte de l'âge adulte des souris. C'est dans ce contexte que l'article du même groupe [23] paru en mai 2010 est particulièrement intéressant. Les mutants *Hoxb8* n'ont pas seulement un phénotype « psy », ils ont aussi une réponse altérée aux stimuli thermiques et nociceptifs attribués à la désorganisation des circuits neuronaux au niveau de la moelle épinière, niveau compatible avec le domaine d'expression normal de *Hoxb8*. Dans ce nouvel article, l'équipe de Capecchi démontre que, contrairement à ce qu'ils pensaient, *Hoxb8* n'est pas exprimé dans les neurones, mais dans les microglies, donc dans des dérivés de monocytes d'origine périphérique. Cette démonstration est faite en trois temps. Le premier est l'expression microgliale. Le second est que la transplantation de moelle osseuse normale, dans les souris invalidées pour *Hoxb8* et irradiées, corrige le phénotype TOC. La troisième est que la recombinaison spécifique de *Hoxb8* dans la moelle osseuse induit le TOC (mais pas le phénotype nociceptif). Les microglies exprimant Hoxb8 (40 % des microglies) sont très peu nombreuses à la naissance et concentrées essentiellement dans le plexus choroïde, les méninges et le long des ventricules. Les cellules migrent alors vers le cortex cérébral avec une concentration maximale vers P14. Cela colle très bien avec l'idée que les microglies sont des monocytes périphériques qui envahissent le système nerveux au cours de

son développement. Donc les microglies *Hoxb8* ont une fonction physiologique importante et inattendue dans le CNS.

Je termine par la question de la migration des microglies. Davalos et ses collègues [24] démontrent en 2005 que l'ATP intervient dans la réponse microgliale à des lésions locales du cerveau. En insérant un gène encodant une protéine fluorescente dans un gène microglial, les chercheurs ont observé les cellules *in vivo*. Même si la morphologie générale des cellules reste stable, les branches fines (terminales) sont en extension et rétraction permanentes. À la suite d'une lésion locale (laser) de 15 µm de diamètre, les cellules proches de la zone lésée répondent dans les minutes qui suivent. Les prolongements deviennent « bulbeux », puis s'étendent vers le site lésé à une vitesse de 1,25 µm/min. Approximativement 30 minutes après la lésion, les prolongements proches sont dans la place, semblent fusionner et entourent la lésion. En revanche, les corps cellulaires restent immobiles, au moins pour une dizaine d'heures. Les cellules plus lointaines (75 à 125 µm de la lésion) réagissent aussi en envoyant leurs prolongements vers le site lésé. Cela suggère que ce site envoie des signaux capables d'attirer les prolongements des microglies.

Pour évaluer un rôle possible de ce nucléotide, ces chercheurs ont introduit de l'ATP et infligé la lésion laser, avec l'idée de perturber les gradients ou de saturer les récepteurs, bref de gêner le processus physiologique. C'est ce qui s'est passé pour les concentrations entre 1 et 10 mM. La même inhibition est observée avec de l'ADP ou de l'UTP, mais pas avec du CTP. Cela suggère que ces purines sont bien les médiateurs de la réaction des microglies. Parmi les récepteurs aux purines, on distingue ceux qui ouvrent un canal ionique (famille P2X) et ceux qui activent une protéine G (P2Y). À l'aide d'inhibiteurs spécifiques, on a tranché en faveur de P2Y. Pour les détails, je renvoie aux articles de Orr, Chekeni et leur collègues [25, 26].

Je reviens à la neurogenèse adulte et pars de la revue par Deng et ses collègues [27] pour rappeler la cinétique de neurogenèse. L'hippocampe est une structure cruciale pour la mémoire épisodique et spatiale. À travers des interactions avec des structures cérébrales associées au traitement des émotions, l'hippocampe est aussi impliqué dans les comportements émotionnels. La neurogenèse commence avec la prolifération des NPC (*Neural Precursor Cells*) dans la zone subgranulaire (SGZ). La plupart des NPC deviennent des neurones (*Dentate granule cells*, DGC). Pendant la première semaine qui suit leur naissance, ces DGC se différencient et migrent dans la couche des grains internes du gyrus denté. À ce stade, elles ne sont pas intégrées au réseau neuronal ni activées par les interneurones GABA présents. Pendant la deuxième semaine de leur existence, ces neurones se différencient mais restent immatures sur le plan électrophysiologique. Pendant la troisième semaine, elles s'intègrent dans les circuits synaptiques. Ces synapses nouvelles s'ajoutent aux synapses anciennes, ou les remplacent, ou alors elles disparaissent. Cette intégration, en troisième semaine, correspond à la transition des neurones GABA qui, d'excitateurs, deviennent inhibiteurs. La survie des nouveaux neurones dépend de l'activité glutamatergique (NMDA). Bref, nous avons des neurones bien intégrés dans le circuit hippocampique. La maturation se poursuit cependant et les neurones ne sont pleinement matures qu'au bout de 4 à 6 semaines.

Une implication concernant le rôle de la mémorisation et de l'apprentissage est que la neurogenèse doit être régulée par des facteurs associés à l'état cognitif et comportemental. La course stimule la neurogenèse, mais c'est aussi le cas d'un environnement riche (des jouets, des roues, etc.). Cet effet de l'apprentissage porte sur la survie des neurones nés 7 jours plus tôt, pas sur la neurogenèse à proprement

parler. La phase tardive de l'apprentissage s'accompagne d'une forte augmentation de l'apoptose des cellules nées aux phases précoces de l'apprentissage (7 à 10 jours plus tôt) avec une augmentation de la prolifération dans la SGZ. Bloquer l'apoptose bloque aussi l'induction de la prolifération et l'apprentissage. La population importante pour l'apprentissage serait celle de 14 jours environ, et sa stabilisation et celle de l'apprentissage demandent la mort des cellules de 7 jours (avec une stimulation de la prolifération). Il est intéressant de constater que c'est l'âge de l'intégration dans les circuits neuronaux.

Une question importante dans la neurogenèse, au cours du développement comme chez l'adulte, est que toutes les cellules générées ne survivent pas. En fait, seule une minorité de ces cellules passent la période critique de stabilisation et sont insérées dans les réseaux de neurones. Il y a donc une sélection qui s'opère, dont le sens physiologique n'est pas clair, mais qui pourrait correspondre à une sélection « darwinienne ». La conception dominante est que les cellules meurent au stade de neurone immature. Mais en réalité, on constate une chute brutale du nombre de cellules à un stade bien antérieur [28]. Une possibilité presque triviale est que ces cellules doivent être éliminées par phagocytose et que les microglies sont chargées de ce nettoyage. Chez l'adulte, plus de 90 % des cellules sont phagocytées.

Cette phagocytose est le fait de microglies ramifiées (non amiboïdes donc non activées) qui sont dispersées parmi les progéniteurs et les neuroblastes. Environ 30 % de chaque catégorie cellulaire est en contact direct avec un prolongement de microglie. Cette phagocytose se fait par l'intermédiaire d'une structure particulière induite et présente sur les prolongements des cellules, une sorte de boursouflure (*pouch*) phagocytique qui avale la cellule apoptotique. Il est donc acquis que toutes les cellules générées au niveau de la zone subgranulaire ne survivent pas. C'est même une minorité des cellules nouvellement générées qui passent une période critique et sont insérées dans les réseaux neuronaux. Après insertion, il y a une deuxième période critique d'élimination de certains neurones, les survivants s'ajoutant aux anciens ou les éliminant. Le sens de cette sélection n'est pas clair. Il peut s'agir de l'élimination des « ratés ». Il peut aussi s'agir de la sélection d'un répertoire. Mais dans un cas comme dans l'autre, cela veut dire que la neurogenèse est génératrice d'une diversité. Toutes les cellules ne sont pas identiques.

Si on rassemble les différents résultats, il semble qu'une sélection s'opère pendant les jours 1 à 4 (perte de 56 % des cellules), puis qu'une deuxième phase se mette en place, plus tardivement, entre les jours 4 et 8 (25 % de mort). Insistons sur les points suivants. Chez les jeunes adultes, la première période critique pour la survie des cellules nouvellement générées est à 4 jours et inclut les cellules en prolifération (compartiment d'amplification) et les jeunes neuroblastes. Cette constatation est à mettre en regard de la période de 2 à 4 semaines, généralement étudiée, et au cours de laquelle les neuroblastes tardifs survivent plus ou moins en fonction du compartiment animal (exercice, drogues, hormones, etc.). Il y aurait donc deux périodes critiques. Cette constatation a aussi été faite pour les neurones qui peuplent le bulbe olfactif. Des périodes critiques sont aussi observées au cours du développement avec une mort de cellules en prolifération (avant l'innervation des cibles). La fonction de couplage entre prolifération et mort n'est pas connue et je vais vous proposer une spéculation sur ce thème. Mais auparavant, une deuxième conclusion est que la phagocytose n'est pas seulement une propriété des microglies activées, phénomène bien connu et relié à des situations pathologiques, et d'autre part, que ces cellules macrophagiques font partie intégrale de la niche neurogénique.

Génération de la diversité

Il me faut d'abord définir ce qu'est un transposon et plus précisément pour ce qui nous concerne ici un rétrotransposon. Je commence par les éléments transposables, autrefois appelés gènes sauteurs, découverts dans les années 1950 par Barbara McClintock. Ces éléments ont dans leur séquence toutes les instructions nécessaires pour s'exciser d'un ADN et se réinsérer dans une autre région. Ce changement de position peut interrompre une séquence codante ou s'insérer dans une région non-codante (je rappelle que ces régions non-codantes représentent 98 % du génome). Mais le fait que cet ADN ne soit pas codant n'en fait pas de l'ADN « poubelle », malgré la force d'un raccourci qui a fait fureur, et une telle insertion peut être sans effet ou bien avoir des effets sur l'expression génétique (de légers à massifs), soit parce que l'insertion est proche d'une séquence régulatrice, soit parce qu'elle modifie la structure de la chromatine.

Ces effets ne sont pas forcément délétères et contribuent à la diversité génétique des organismes. De ce fait, il est nécessaire de comprendre comment leur activité est régulée. Les éléments transposables sont dispersés dans le génome dont ils peuvent constituer une partie importante. On en distingue deux types. Les transposons à ADN et les rétrotransposons. Les rétrotransposons agissent *via* un intermédiaire ARN, ce qui veut dire qu'ils sont transcrits en ARN puis rétrotranscrits en ADN avant d'être réinsérés dans le génome. Ces rétrotransposons sont aussi divisés en plusieurs familles avec ou sans LTR (*Long Terminal Repeats*). Nous nous intéressons ici aux rétrotransposons sans LTR (les LINEs, pour *Long Interdispersed Nuclear Elements*). Il reste actuellement un million de LINEs dans le génome humain, duquel ils composent environ 20 %. La plupart de ces séquences sont « fossilisées », incapables de bouger parce qu'elles ont perdu des éléments essentiels à leur mobilité. Mais entre 50 à 100 sont toujours actifs (capables de transposer et non immobilisés, à comparer avec 3000 LINEs actifs chez la souris), pas tous d'ailleurs au même niveau, certains LINEs, une dizaine environ, étant plus actifs que les autres. Les LINEs ont aussi une autre fonction qui est de permettre la transposition des SINEs.

Je commence par un article de 2005 [29]. Au cours d'expériences dans lesquelles des cellules souches neurales à basse densité avaient été cultivées en présence de FGF-2, les auteurs avaient observé une surexpression de L1 (LINE-1, donc). Ayant fait cette observation, ils ont testé si le promoteur de L1 (le 5'UTR de L1) pouvait fonctionner dans des cellules souches neurales de rat. En effet, les TE transportent leurs promoteurs ce qui augmente leur chance d'être exprimés, où qu'ils s'insèrent. Nul besoin d'utiliser les promoteurs des gènes en place (quand gène il y a, car l'insertion peut se faire dans les séquences non codantes). Dans la mesure où un facteur de transcription Sox2 exprimé dans les cellules souches neurales non différenciées était soupçonné de réprimer L1, un certain nombre d'expériences ont été faites, destinées à évaluer cette hypothèse. On a ainsi démontré que dans les cellules souches neurales de rat, Sox2 inhibe l'activation d'un L1 humain.

Pour étudier une possible rétrotransposition de L1 humain chez le rat – ou la souris –, il fallait un outil. L'idée fut d'introduire le gène GFP (protéine fluorescente) inversé, avec un intron dans le gène L1, juste après le 3'UTR et avant la séquence de polyadénylation. Les cellules ayant incorporé le vecteur sont sélectionnées grâce à un gène de résistance à la puromycine. Après transcription, le messager est épissé, ce qui raboute les deux bouts codants, mais la séquence est encore inversée. Puis la transcription réverse démarre à partir du polyA et l'ADN réintégré dans l'ADN

avec le transposon peut être transcrit, ce qui donne une coloration verte à la cellule. Ce qui veut dire que chaque fois qu'on voit la GFP, il y a eu rétrotransposition. Le fragment GFP peut aussi être suivi par PCR (fragment de 343 paires de bases).

Les auteurs ont décrit leur construction chez la souris, par transgénèse, et démontré qu'on peut suivre la rétrotransposition au cours du développement et chez l'adulte. La marque d'une rétrotransposition dans le système nerveux (à quelque stade qu'elle ait eu lieu) est signée par la GFP. On constate l'expression de la GFP dans plusieurs structures cérébrale (striatum, cortex, hypothalamus, hippocampe, cervelet, amygdale, etc.). Les formes vertes rappellent des neurones et il semble que la rétrotransposition soit absente dans les oligodendrocytes et les astrocytes. Tout cela confirme que les neurones sont les cibles principales de la rétrotransposition et que celle-ci n'est pas induite dans les cellules souches, mais seulement au cours de leur différenciation en neurones. Au-delà de cette confirmation, on peut constater que cette rétrotransposition se produit aussi dans des structures qui ignorent la neurogenèse adulte. Ce qui veut dire que cette variabilité est générée dans presque toutes les structures cérébrales à des stades variables de leur développement. On peut avoir le même génome, on n'aura pas forcément le même cerveau. Et pour ce qui est de la vie adulte, cette modification va se poursuivre au niveau des régions neurogéniques adultes – avec le *caveat* (important) que nous sommes là dans un cas particulier de l'insertion d'un rétrotransposon humain chez la souris.

Ce qui veut dire que si le système hybride étudié ouvre sur la possibilité (*via* ce mécanisme) d'une génération de diversité chez l'humain, il ne la démontre pas formellement. On pourrait en effet imaginer que notre espèce aurait inventé un mécanisme de stabilisation de l'information génétique. D'où l'intérêt de l'article publié en 2009 par la même équipe qui démontre la rétrotransposition dans des cellules souches neurales humaines [30]. Évidemment il s'agit d'expériences *in vitro*, sur des cellules souches neurales humaines.

Pour aller vers l'*in vivo*, de l'ADN génomique a été préparé à partir de l'hippocampe, du cervelet, du foie et du cœur d'un même individu (pour plusieurs individus). La première observation est que tous les individus ne sont pas égaux, certains ayant une différence entre tissus plus marquée que d'autres. Cette analyse a été étendue à d'autres régions du système nerveux, gyrus denté, CA1, CA3, cortex frontal, cortex pariétal, SVZ, noyau caudé, tronc cérébral, cervelet, moelle épinière. Ce qu'on remarque est l'existence de différences assez marquées entre individus et entre régions cérébrales, avec une activité L1 mille fois plus forte dans le tissu nerveux que dans le cœur ou le foie. La présence de rétrotransposons dans des tissus qui ignorent la neurogenèse adulte confirme l'idée que les neurones sont le site d'une forte rétrotransposition au cours du développement. En effet, la rétrotransposition, à ce jour, exige de la prolifération cellulaire. La signification physiologique de ces rétrotranspositions reste à établir.

Ce qui m'amène à un article [31] qui suggère que l'environnement peut modifier le niveau de rétrotransposition dans l'hippocampe adulte. Les auteurs se proposent de démontrer que la rétrotransposition de L1 dans les NPCs et donc l'insertion de L1 dans les neurones matures sont régulées par l'environnement. Le modèle expérimental est toujours la souris transgénique exprimant le L1-GFP humain et les souris porteuses du transgène sont élevées pendant 15 jours soit dans des cages avec une roue à barreaux, ce qui leur permet de courir, soit dans des cages avec une roue dont les barreaux ont été retirés. Comme anticipé, les cellules nouvellement formées survivent mieux chez les sportifs. Parallèlement, en utilisant le vecteur permettant

de mesurer les taux de rétrotransposition, les auteurs concluent qu'on a plus de cellules marquées chez les coureurs. Bien qu'amusante, cette expérience mériterait d'être confirmée avec un L1 de souris, et en vérifiant que le nombre de cellules marquées ne reflète pas une modification de survie plutôt qu'une augmentation de la transposition.

Je reviens donc à des données qui concernent la question des modifications épigénétiques et de leur rôle dans la rétrotransposition en me bornant aux méthylations de l'ADN au niveau des CpG. Je rappelle que les CpG méthylés recrutent des protéines, en particulier MeCP2, à l'origine de la formation d'un complexe qui inhibe la transcription. Dans ce nouvel article, les auteurs rappellent que le promoteur de L1, dans les cellules qui n'expriment pas L1 (pas encore en voie de différenciation) est lié à Sox2 et aussi à HDAC1 (une histone déacétylase), deux partenaires de MeCP2. Afin d'évaluer le rôle possible de MeCP2 sur l'activité L1, les auteurs ont eu recours au même gène rapporteur déjà décrit et concluent sur l'importance de la méthylation pour inhiber l'activité L1 dans des cellules souches neurales. Pour passer *in vivo*, les auteurs ont comparé les cerveaux de souris sauvages et MeCP2-KO, du point de vue de l'expression de L1 chez des souris L1-GFP et démontre que le nombre de cellules GFP est dramatiquement augmenté chez le MeCP2-KO.

Terminons par une considération sur une pathologie appelée syndrome de Rett, maladie qui affecte les filles et dont les symptômes neurologiques apparaissent entre le 6^{e} et le 8^{e} mois. Cette maladie est due à une mutation du gène MeCP2. Pour cette raison, l'équipe de Gage a été rechercher si la rétrotransposition L1 était modifiée dans des progéniteurs neuraux dérivés de patients. Il ne s'agit pas de prendre ces progéniteurs chez les patients, évidemment, mais d'utiliser la technologie qui consiste à fabriquer des iPS à partir de fibroblastes de patients puis de générer des cellules souches neurales à partir de ces iPS. Ces cellules souches portent la mutation et fournissent donc un modèle intéressant pour l'étude de la maladie. On constate que le taux de rétrotransposition est plus élevé chez les cellules issues de malades que chez les cellules normales et que ce taux retrouve un niveau normal si on exprime MeCP2 dans les cellules affectées. À partir de tissus (cerveau et cœur) de patients décédés, on constate que ce taux de transposition est plus élevé chez les malades que chez les témoins et qu'il affecte particulièrement le tissu cérébral. Cela ne veut pas dire que la maladie soit liée à des rétrotranspositions, mais ne permet non plus d'exclure un rôle joué par cette rétrotransposition dans certains symptômes.

Il me reste à discuter un dernier article [32], toujours du même groupe, qui explique comment (ou pourquoi) la rétrotransposition est induite au moment où les cellules souches neurales se différencient dans la voie neuronale. La prolifération de ces cellules est régulée par Wnt3A, un facteur de la famille Wnt secrété par les astrocytes, prolifération qui accompagne l'engagement dans la voie de différenciation neuroblastique. Cette différenciation exige l'expression d'un certains nombre de gènes neurogéniques dont NeuroD1. Dans les cellules souches non différenciées, NeuroD1 est inactif du fait de la répression exercée par Sox2 et HDAC1. On s'en souvient, ce même complexe est lié au promoteur de L1 et l'activation de L1, au cours de la différenciation, s'accompagne du détachement de Sox2 et HDAC1. On peut donc conclure qu'il existe une corrélation étroite entre la différenciation dans le sens neural et la rétrotransposition, à un stade où les cellules sont en prolifération mais sont quand même engagées dans la voie neurale.

Pour conclure, je constate que je n'ai pas traité l'ensemble du programme. Nous avons « oublié » la régénération axonale et laissé de côté les périodes critiques. Mais cela a été compensé par du temps passé sur les microglies, que nous n'avons pas uniquement traitées sous l'angle de la réaction inflammatoire qui suit une lésion, neurologique, mécanique ou vasculaire, mais aussi sous celui d'une participation à la physiologie cérébrale. Dans cette physiologie, nous avons introduit le renouvèlement cellulaire pour aboutir, à travers le pourquoi de la mort de la grande majorité des cellules nouvelles, à ces histoires de rétrotransposons et de génération de répertoires donnant lieu à une sélection que nous avons, par facilité, nommée darwinienne.

Références

[1] Altman J. & Das G.D., « Post-natal origin of microneurones in the rat brain », *Nature*, 207, 1965, 953-956.

[2] Altman J. & Das G.D., « Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats », *J Comp Neurol,* 124, 1965, 319-335.

[3] Kaplan M.S. & Hinds J.W., « Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs », *Science,* 197, 1977, 1092-1094.

[4] Bayer S.A., Yackel J.W. & Puri P.S., « Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life », *Science,* 216, 1982, 890-892.

[5] Goldman S.A. & Nottebohm F., « Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain », *Proc Natl Acad Sci U S A,* 80, 1983, 2390-2394.

[6] Paton J.A., O'Loughlin B.E. & Nottebohm F., « Cells born in adult canary forebrain are local interneurons », *J Neurosci,* 5, 1985, 3088-3093.

[7] Alvarez-Buylla A., Theelen M. & Nottebohm F., « Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during, and after song learning », *Proc Natl Acad Sci U S A,* 85, 1988, 8722-8726.

[8] Barnea A. & Nottebohm F., « Seasonal recruitment of hippocampal neurons in adult free-ranging black-capped chickadees », *Proc Natl Acad Sci U S A,* 91, 1994, 11217-11221.

[9] Rakic P., « Limits of neurogenesis in primates », *Science,* 227, 1985, 1054-1056.

[10] Gould E., « How widespread is adult neurogenesis in mammals? », *Nat Rev Neurosci* 8, 2007, 481-488.

[11] Eriksson P.S. *et al.,* « Neurogenesis in the adult human hippocampus », *Nat Med,* 4, 1998, 1313-1317.

[12] Magavi S.S., Leavitt B.R. & Macklis J.D., « Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice », *Nature,* 405, 2000, 951-955.

[13] Chen J., Magavi S.S. & Macklis J.D., « Neurogenesis of corticospinal motor neurons extending spinal projections in adult mice », *Proc Natl Acad Sci U S A,* 101, 2004, 16357-16362.

[14] Sirko S. *et al.*, « Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex », *Brain,* 132, 2009, 2252-2264.

[15] Costa M.R., Kessaris N., Richardson W.D., Gotz M. & Hedin-Pereira C., « The marginal zone/layer I as a novel niche for neurogenesis and gliogenesis in developing cerebral cortex », *J Neurosci,* 27, 2007, 11376-11388.

[16] Rahpeymai Y. *et al.,* « Complement: a novel factor in basal and ischemia-induced neurogenesis », *EMBO J,* 25, 2006, 1364-1374.

[17] Kolb B. *et al.,* « Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats », *J Cereb Blood Flow Metab,* 27, 2007, 983-997.

[18] Nakatomi H. *et al.,* « Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors », *Cell,* 110, 2002, 429-441.

[19] Mohyeldin A., Garzon-Muvdi T. & Quinones-Hinojosa A., « Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche », *Cell Stem Cell,* 7, 2010, 150-161.

[20] Ables J.L. *et al.,* « Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells »,. *J Neurosci,* 30, 2010, 10484-10492.

[21] Parkhurst C.N. & Gan W.B., « Microglia dynamics and function in the CNS », *Curr Opin Neurobiol,* 20, 2010, 595-600.

[22] Greer J.M. & Capecchi M.R., « Hoxb8 is required for normal grooming behavior in mice », *Neuron,* 33, 2002, 23-34.

[23] Chen S.K. *et al.,* « Hematopoietic origin of pathological grooming in Hoxb8 mutant mice », *Cell,* 141, 2010, 775-785.

[24] Davalos D. *et al.,* « ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo », *Nat Neurosci,* 8, 2005, 752-758.

[25] Orr A.G., Orr A.L., Li X.J., Gross R.E. & Traynelis S.F., « Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction », *Nat Neurosci,* 12, 2009, 872-878.

[26] Chekeni F.B. *et al.,* « Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis », *Nature,* 467, 2010, 863-867.

[27] Deng W., Aimone J.B. & Gage F.H., « New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? », *Nat Rev Neurosci,* 11, 2010, 339-350.

[28] Sierra A. *et al.,* « Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis », *Cell Stem Cell,* **7**, 2010, 483-495.

[29] Muotri A.R. *et al.,* « Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition », *Nature,* 435, 2005, 903-910.

[30] Coufal N.G. *et al.,* « L1 retrotransposition in human neural progenitor cells », *Nature,* 460, 2009, 1127-1131.

[31] Muotri A.R., Zhao C., Marchetto M.C. & Gage F.H., « Environmental influence on L1 retrotransposons in the adult hippocampus », *Hippocampus,* 19, 2009, 1002-1007.

[32] Kuwabara T. *et al.,* « Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis », *Nat Neurosci,* 12, 2009, 1097-1105.

RECHERCHE

Patrons de développement et migrations cellulaires

Nous avons montré pour la première fois, sur le modèle Drosophile, que Engrailed, un facteur de transcription de la famille des homéoprotéine est un morphogène au sens strict du terme. En effet, Engrailed extracellulaire est nécessaire au développement de la « Anterior Cross Vein (ACV) » dans le disque imaginal de l'aile de Drosophile. Cette activité non autonome directe d'Engrailed nécessite une interaction physiologique avec la signalisation par DPP (Layale *et al*., *Development,* 2011).

Pour la migration cellulaire, nous avons démontré que Pax6 extracellulaire régule la migration des précurseurs d'oligodendrocytes entre E3 et E7 dans le tube neural de poulet (Di Lullo, Haton *et al*., *Development*, 2011).

Guidage des axones

Cette année nous sommes repartis des travaux publiés en 2009 (Wizemann *et al*., *Neuron,* 2009) pour mieux comprendre le mécanisme de guidage des axones rétinien par Engrailed extracellulaire. Nous avons démontré que la protéine internalisée par

les cônes de croissance régule localement la traduction de mRNA mitochondriaux et augmente la synthèse d'ATP. Cet ATP est sécrété, hydrolysé en Adénosine, laquelle transmet un signal *via* l'activation du récepteur AR1. Cette stimulation sensibilise le cône de croissance à la signalisation par le système EphrinA5/EphA2. Comme dans le cas de la Drosophile (voir plus haut), on constate une interaction entre la signalisation par Engrailed et une voie classique de signalisation (Stettler *et al*., sous presse à *Development*).

Périodes critiques

En 2008, une de nos publications soutenait que l'ouverture de la plasticité corticale dans le système visuel binoculaire (chez la souris) est contrôlée par l'internalisation de l'homéoprotéine Otx2 par les interneurones GABAergique à parvalbulmine du cortex visuel binoculaire (Sugiyama *et al.*, *Cell*, 2008). Cette internalisation requiert l'existence de sites de reconnaissance pour la protéine et aussi de séquences de la protéine capable de reconnaître ces sites. Nous avons identifié le domaine d'Otx2 et démontré que par l'intermédiaire de ce domaine Otx2 reconnaît un sucre complexe de la famille des chondroïtines sulfatés (CSD ou CSE). Enfin, nous avons aussi démontré que ce domaine peut être utilisé comme antagoniste du transfert d'Otx2 *in vivo,* ce qui conduit à une réouverture de la plasticité corticale chez l'adulte (Beurdely, Spatazza *et al*., en révision).

Toujours sur ce thème, nous avons identifié le plexus choroïde comme source d'Otx2 et démontré que l'inactivation d'Otx2 dans le plexus diminue les niveaux d'Otx2 dans les cellules à parvalbumine. L'effet de cette inactivation dans le plexus sur la plasticité corticale est en cours d'analyse.

Finalement, le phénotype d'une souris dans laquelle deux acides aminés essentiels à la reconnaissance des cellules à parvalbumine ont été mutés est en cours d'étude.

Pathologies

Nous nous intéressons à deux pathologies, la maladie de Parkinson et le glaucome. Pour la maladie de Parkinson, nous avions démontré en 2007 (Sonnier *et al*., *J. Neurosci*., 2007) que Engrailed1/2 est fortement exprimé dans les neurones dopaminergiques mésencéphaliques mDA) de la substance noire et de la VTA et que ces neurones meurent progressivement chez les souris hétérozygotes pour *En1*. Mieux, l'infusion de la protéine En1 suivie de son internalisation par les neurones sauve ces cellules de la dégénérescence.

Depuis, nous avons démontré que ce sauvetage passe par la traduction locale, sous le contrôle de En1 des messagers mitochondriaux codant pour des protéines mitochondriales du complexe I. Cela nous a conduit à tester l'action protectrice d'En1 dans d'autres modèles *in vivo* dont le MPTP, la 6-OHDA et l'infusion d'alpha-synucléine mutée (A30P). En1 protège dans ces trois modèles, ce qui suggère qu'on pourrait l'utiliser comme protéine thérapeutique (Alvarez-Fischer, Fuchs *et al.*, *Nature Neurosci*., 2011).

Toujours dans le modèle de la maladie de Parkinson, mais aussi du rôle physiologique normal d'Engrailed, nous avons identifié de nombreuses cibles traductionnelles et transcriptionnelles de la protéine dans les neurones mDA.

Nous avons aussi développé un modèle expérimental de glaucome chez la souris et utilisé Otx2 comme protéine thérapeutique. Cette protéine injectée dans la cavité oculaire et internalisée par les neurones ganglionnaire (RGC) sauve la totalité de ces neurones dans le modèle d'excitotoxicité au NMDA et aussi dans un modèle de lésion du nerf optique. Dans le cas de la toxicité par NMDA, nous avons aussi démontré qu'Otx2 non seulement sauve les cellules mais préserve l'acuité visuelle des souris (Torero-Ibad, Rheey *et al*., *J. Neurosci*., 2011).

Travaux des équipes de chaire

La chaire de Processus morphogénétiques abrite deux équipes, l'une dirigée par Sophie Vriz (professeur à Paris VII Denis-Diderot) et l'autre par Alain Joliot (directeur de recherche au CNRS).

Sophie Vriz

Nous avons renforcé notre collaboration avec Ludovic Jullien (ENS, Paris) et David Bensimon (ENS, Paris) en développant des poissons transgéniques exprimant une protéine Gal4-ER^{T2} qui, couplée à l'utilisation du cyclofen cagé, nous permet de photo-induire l'expression de séquences dépendantes des motifs UAS avec une précision spatiotemporelle de l'ordre de la cellule et de la minute.

Signalisation purinergique et recrutement de cellules progénitrices après lésion

Un enjeu majeur en médecine régénérative est le contrôle de la mobilisation des cellules progénitrices. L'apoptose a récemment été rapportée comme jouant un rôle dans le remodelage cellulaire chez l'adulte ; nous avons étudié son implication, et son mode d'action possible, dans la régénération de la nageoire caudale adulte. Nous avons montré que l'amputation de la nageoire induit deux vagues d'apoptose strictement régulées dans le temps et l'espace. L'inhibition de l'apoptose bloque la régénération et nous avons montré que l'apoptose était nécessaire à la fois pour la formation du blastème et la croissance des nerfs. Les deux processus peuvent être restaurés par un ajout d'adénosine exogène *via* son récepteur A2B. Nos résultats montrent la voie de la purinergique comme un relais entre l'apoptose et la mobilisation des cellules progénitrices et de croissance nerveuse pendant la régénération. Ce travail est actuellement en cours d'expertise.

Rôle de la protéine Engrailed (En) dans la formation de la frontière mésencéphale / diencéphale

En est impliquée dans la formation des territoires du neuro-épithélium et dans le guidage des cônes de croissance. Nous avons étudié le rôle paracrine d'Engrailed dans la mise en place de la frontière mésencéphale / diencéphale (DMB) chez le poisson zèbre. Pour cela, nous avons utilisé deux stratégies : (1) un blocage de la protéine En à l'extérieur des cellules à l'aide d'un anticorps spécifiques ; (2) une surexpression d'une protéine EnERT2 dont l'activité est contrôlée par la lumière.

Alain Joliot

La thématique centrale de l'équipe est la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent le mode d'action paracrine des homéoprotéines. Ce dernier processus implique le transfert des homéoprotéines entre deux cellules et soulève deux interrogations majeures relatives, d'une part, à la sécrétion de protéines nucléaires, et d'autre part, à la translocation de protéines hydrophiles au travers de membranes biologiques. Ce comportement n'est pas sans rappeler celui du FGF2 et nous avons démontré que les homéoprotéines et le FGF2 partagent des voies communes de sécrétion atypique impliquant notamment une participation active du compartiment nucléaire. Pour ces deux protéines, l'interaction directe avec des composés lipidiques (les PIP2) pourrait constituer une étape critique de leur translocation au travers de la membrane plasmique.

PUBLICATIONS DES TROIS ÉQUIPES 2010-2011

Équipe Sophie Vriz

Sinha D., Neveu P., Gagey N., Aujard I., Benbrahim-Bouzidi C., Le Saux T., Rampon C., Gauron C., Goetz B., Dubruille S., Baaden M., Volovitch M., Bensimon D., Vriz S., Jullien L., « Photocontrol of protein activity in cultured cells and zebrafish with one- and two-photon », *ChemBioChem,* 11(5), 2010, 653-663.

Sinha D., Neveu P., Gagey N., Aujard I., Le Saux T., Rampon C., Gauron C., Kawakami K., Leucht C., Bally-Cuif L., Volovitch M., Bensimon D., Jullien L., Vriz S., « Photo-activation of the CreER^{T2} recombinase conditional site-specific recombination with hogh spatio-temporal résolution », *Zebrafish*, 7(2), 2010, 199-204.

Bouzaffour M., Rampon C., Ramaugé M., Courtin F., Vriz S., « Differential effect of thyroid hormones during regeneration in zebrafish », *Gen Comp. Endo,* 168, 2010, 88-94.

Hoang T.Q., Rampon C., Freyssinet J.M., Vriz S., Kerbiriou-Nabias D., « A method to assess the migration properties of cell-derived microparticles within a living tissue », *BBA-GEN SUBJECTS,* 2011, sous presse.

Ceccaldi A., Champion C., Rampon C., Sénamaud-Beaufort C., Ponger L., Jurkowska R., Gagey N., Dali Dali Ali H., Lequin O., Tost J., Vriz S., Dauzonne D., Jeltsch A., Guianvarc'h D., Arimondo P., « In quest of DNA methyltransferase inhibitors: new flavones and flavanones derivatives were identified through High-Throughput Screening », *ChemBioChem,* 12(9), 2011, 1337-45.

Rampon C., Gauron C., Bouzaffour M., Cosson A., Volovitch M., Vriz S., « Apoptosis triggers adult fin regeneration through adenosine mediated signaling », soumis pour publication.

Ellertsdottir E.*, Berthold P.*, Bouzaffour M., Tillet M., Trayer V., Gauron C., Dufourcq P., Huber Ph., Vriz S., Affolter M., Rampon C., « Protease-activated receptor 1 (PAR1) promotes vascular maturation in the zebrafish embryo », soumis pour publication.

Équipes Alain Joliot et Alain Prochiantz

Layalle S., Volovitch M., Mugat B., Bonneaud N., Parmentier M.L., Prochiantz A. Joliot A. et Maschat F.*, « Engrailed homeoprotein acts as a signaling molecule in the developing fly. Development », 138 (11), 2011, 2315-23.

---

*co-premier auteur ou co-senior auteur.

Dupont E., Prochiantz A. et Joliot A., « Penetratin story: an overview », *Methods Mol Biol 683*, 2011, 21-29.

Torero-Ibad R., Rheey J., Mrejen S., Foster V., Picaud S., Prochiantz A.* et Moya K.*, « Otx2 promotes the survival of damaged adult retinal ganglion cells and protects against exitotoxic loss of visual acuity in vivo », *J. Neurosci*., 31, 2011, 5495-5503.

Alvarez-Fisher D., Fuchs J., Castagner F., Stettler O., Massiani-Beaudoin O., Moya K.L., Bouillot C., Oertel W.H., Lombès A., Faigle W., Joshi R.L.*, Hartmann A.* et Prochiantz A.*, « Engrailed proteins protect mouse midbrain dopaminergic neurons against mitochondrial complex I insults and regulate their physiology », *Nature Neurosci.*, 14, 2011, 1260-1268.

Beurdeley M.*, Spattaza J.*, Bogart L.*, Sugiyama S., Bernard C., Di Nardo A., Hensch T.K.* et Prochiantz A.*, « Perineuronal nets localize Otx2 homeoprotein to parvalbumine in post-natal visual cortex », en revision.

Stettler O., Joshi R.L., Reingruber J., Holcman D., Bouillot C., Prochiantz A.* et Moya K.L.*, « Engraied homeoprotein recruits the adenosine A1 receptor to potentiate Ephrin A5 function in retinal growth cone », *Development*, sous presse.

Di Lullo E.*, Haton C.*, Le Poupon C., Volovitch M., Joliot A., Thomas J.-L.* et Prochiantz A.*, « Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube », *Development*, 138, 2011, 4991-5001.

PARTICIPATION À DES CONGRÈS 2010-2011 (*INVITED SPEAKER*)

Alain Prochiantz

– Cavailles-Lautman-Canguilhem : Le Concept, l'Être, La Vie, École normale supérieure, 22 et 23 janvier 2010.

– Neurobiology: from molecules to systems, 8-9 février, 2010, Montpellier.

– The 1st Symposium for the Global Research Laboratory (GRL) Program of Korea, 23 février 2010, Corée du Sud.

– Imaging Brain Plasticity, 1er-2 avril 2010, Paris.

– WE-Heraeus Seminar on Biophysics of Membrane-Active Peptides, 11-14 avril 2010, Bad Honneff, Allemagne, *Keynote lecture*.

– Peptide Vectors and Delivery of Therapeutics, 19-21 mai 2011, Tallinn, Lituania.

– Systems Biology of Dopaminergic Neurons, 28-30 avril 2011, Freiburg, Allemagne.

– The Plastic Brain, 8-9 juin 2011, Bâle, Suisse, *Keynote lecture*.

– 36th FEBS Congress, Biochemistry for Tomorrow's Medicine, Turin, Italie.

– Chemistry and Biology of Peptides, 27 juillet, Oxford, Royaume uni, *Keynote lecture*.

– HOX and TALES Transcription Factors in Development and Diseases, 28 septembre-1er octobre 2011, Carry Le Rouet, France, *Keynote lecture*.

Sophie Vriz

– The 7th European Zebrafish Genetics and Development Meeting, 5-9 juillet 2011, Edinburgh, Royaume uni.

Alain Joliot

– Workshop SYMBAD, 18-21 avril 2011, Milan, Italie.