



HAL
open science

Etude anatomique et fonctionnelle du cerveau des souris KO STOP : modèle animal pour l'étude de la schizophrénie

Marion Jany

► **To cite this version:**

Marion Jany. Etude anatomique et fonctionnelle du cerveau des souris KO STOP : modèle animal pour l'étude de la schizophrénie. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT: . tel-00567610

HAL Id: tel-00567610

<https://theses.hal.science/tel-00567610>

Submitted on 21 Feb 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée par

Marion JANY

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1

(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)

Discipline : Biologie cellulaire
Spécialité : Neurobiologie, Neurosciences

**Etude anatomique et fonctionnelle du cerveau des
souris KO STOP : modèle animal pour l'étude de la
schizophrénie**

Soutenue le 22 Octobre 2010

Devant le jury composé de :

Dr Jean-Christophe DELOULME	Directeur de thèse
Pr Claude FEUERSTEIN	Président
Dr Fiona FRANCIS	Rapporteur
Dr Paul SALIN	Rapporteur

Thèse réalisée au sein de l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant
Grenoble-Institut des Neurosciences, INSERM U836, France
Equipe n°1, Physiopathologie du Cytosquelette

A mon très regretté grand père,
le 10 Septembre 2010

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Docteurs Fiona Francis et Paul Salin pour avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteurs. Je n'aurai pas pu mieux espérer que la discussion enrichissante et agréable que nous avons eue lors de ma soutenance. Merci aussi à Claude Feuerstein d'avoir présidé mon jury de thèse.

Je remercie ensuite Annie Andrieux pour m'avoir accueillie depuis mon Master 2 dans son laboratoire. Merci pour ton écoute, tes conseils et ton dynamisme.

Toff... presque 4 ans à tes côtés, et que de choses ont changé... Ah, ça n'a pas été facile tous les jours hein ! Je crois que finalement ça s'appelle l'apprentissage... On ne ressort jamais tout à fait indemne d'une thèse... Et pour dire, c'est grâce à toi si j'en suis arrivée là aujourd'hui. Je repars de cette aventure avec un projet professionnel stable, tu m'as permis d'ouvrir les yeux sur la voie qui me correspondait le mieux et je n'en suis qu'épanouie. Tes enseignements, tes conseils et tes gueulantes, au final ont porté leur fruit : la chenille timide est sortie du cocon et le papillon s'est envolé plein d'entrain pour sa nouvelle vie bordelaise... Merci aussi de m'avoir permis de me révéler sur les différentes techniques que je vais exploiter maintenant, finalement, moi qui était plutôt cellulaire avant d'arriver en M2, j'en ressort très intégrée et ne jure maintenant que par ça. Grâce à toi, j'ai aussi appris à être une « bordélique organisée en quête de rigueur ». Enfin, je ne pourrai jamais assez te remercier pour ce que tu m'as apporté et espère vraiment pouvoir collaborer plus tard avec toi et continuer à vivre des « aujourd'hui c'est vendredi ! ».

Un merci tout particulier à Annie S. et Domi pour les milliers de génotypages et coupages de queues que vous m'avez faits... Plus personnellement je voudrai joindre Nora et vous remercier toutes les 3 chaleureusement pour l'attention et le soutien moral que vous m'avez toujours porté et les moments très sympathiques de la pause du midi ou du café. Maintenant, vous savez ce que c'est les « 5 minutes à la Marion » ! Domi, tes macarons et ta crème au chocolat blanc me manqueront vraiment ☺.

Un grand merci aussi à Yasmina pour les jolies balades en montagne et certaines péripéties que nous avons pu vivre ensemble. J'aurai jamais cru que les ballades en raquettes sous une tempête de neige pouvaient avoir un côté chaleureux ! Merci aussi pour ton énorme soutien, ta gentillesse et ta franchise. Merci aussi pour tes conseils scientifiques et ton humanité. Dommage que pas plus de personnes n'aient ce trait de caractère...

Cricri, merci pour ton sourire et tes blagues. Tes « pioupiou » dans le couloir vont me manquer. Chaque labo devrait avoir son cricri ☺. Merci à Jacques et Eric qui m'ont bien aidé pour toute la partie traitement d'image, stats et comptages. Un grand merci à Hélène pour m'avoir fait découvrir la chirurgie stéréotaxique et j'espère que tu pourras trouver un poste à ta juste valeur pour que tu puisses t'épanouir pleinement ☺. J'espère te revoir bientôt et ma porte sera toujours ouverte si tu veux passer dans la région bordelaise. Merci aussi au reste de l'équipe 1 pour les moments passés ensemble et les différents échanges.

Je remercie ensuite les « jeunes » du labo, les différents étudiants qui ont pu passer dans l'équipe pendant mon M2 et ma thèse et mes collègues de bureau : particulièrement Mathilde et Anouk qui m'ont aidé à surmonter la troisième année (et pas que) avec leur bonne humeur et leur

soutient. Gilles, merci merci pour tout... Il est des personnes qui croisent votre chemin et qu'on n'oublie jamais... Merci tout particulier à Mélina : on va se revoir bientôt et oui ! Dans ce monde où l'individualisme prime sur tout autre chose, toi tu existes, surtout reste comme tu es, quoique tu entendes...

A ma famille,

Papa et maman, vous avez toujours été là, même quand je pétais mon câble au téléphone. Merci d'avoir supporté ces sautes d'humeur, ces pleurs et ce mauvais caractère agrémentés par le stress. Vous avez toujours cru en moi, même quand le moral et la confiance était au plus bas, finalement j'y suis arrivée et c'est aussi grandement grâce à vous qui avez vécu cette thèse en même temps que moi. Maman, les études c'est bien, mais ça ne remplace en rien les valeurs que tu m'as transmises, ne t'inquiète pas, je n'oublie pas d'où je viens ni qui je suis...

Mon frère et Ma sœur, vous m'avez aussi grandement soutenue et je vous en suis très reconnaissante. Vous avez tant fait... Et vous êtes toujours là pour votre « marron ».

Mémé et Pépé... Merci merci et merci. Vos messages chaleureux, les parties de quinze en 2500 et plus, les scoppa, les cartes postales avec les petits chats et les bonbons au miel, ya que ça de vrai. Merci pour votre grand soutien et votre amour. Pépé, j'aurai tellement voulu que tu sois là encore, tu es parti bien trop vite...

A Titi et Tiana, merci d'avoir enchanté ma thèse avec vos bouilles et d'avoir changé ma vie...

A Dam's, tes blagues et tes mots inventés m'ont quelque fois bien redonné le sourire avec ton frangin. « Heuuu, c'est c'quetuv ' !! » « Tu prendras bien du BOMBAILLE TCHAILLE ?!! ». Merci de m'honorer de tant de grâce avec ton surnom fatigant « Mam's cr*tte ».

A Mama... tu as eu un grand courage, ça n'a pas dû être facile pour toi non plus ces années thèse... mais si tu es encore là, c'est plutôt bon signe non ?... Merci pour ton grand soutien, ton aide et ton amour. Pour tous les instants magiques qui m'ont fait retrouver le sourire dans les moments difficiles. Pour ton écoute, de m'avoir supporté... pour toi, tout simplement... Je t'aime.

Enfin pour terminer, un clin d'œil à toutes les personnes et évènements qui ont croisé ma route et qui ont tenté de me décourager, vous m'avez aidé plus que vous ne le pensez, pour ça, je vous remercie...

Table des matières

1	INTRODUCTION GENERALE.....	12
2	RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	17
2.1	LA SCHIZOPHRENIE, UN ENSEMBLE DE PATHOLOGIES	17
2.1.1	CARACTERISATION PSYCHIATRIQUE DES SCHIZOPHRENIES	17
2.1.2	LA SCHIZOPHRENIE, UNE MALADIE DU NEURODEVELOPPEMENT	22
2.1.3	SYMPTOMATOLOGIE CEREBRALE ET INTEGRATIVE DE LA SCHIZOPHRENIE.....	27
2.2	DU CYTOSQUELETTE NEURONAL AUX SCHIZOPHRENIES : IL Y A-T-IL UN LIEN ?	39
2.2.1	LE CYTOSQUELETTE NEURONAL.....	39
2.2.2	LES PROTEINES STOP	52
2.2.3	LES SOURIS INVALIDEES POUR LE GENE DE LA PROTEINE STOP : MODELE ANIMAL POUR L'ETUDE DE LA SCHIZOPHRENIE.....	58
2.2.4	AUTRES MODELES ANIMAUX POUR L'ETUDE DE LA SCHIZOPHRENIE.....	63
2.3	LA NEUROGENESE ADULTE ET LES PSYCHOPATHOLOGIES	69
2.3.1	LES CELLULES GLIALES RADIAIRES (LA GLIE RADIAIRE).....	70
2.3.2	NEUROGENESE ADULTE CHEZ LES MAMMIFERES	82
2.3.3	ROLE FONCTIONNEL DE LA NGA HIPPOCAMPALE.....	98
2.3.4	STATUT DE LA NGA DANS LES NEUROPATHOLOGIES.....	100
3	MATERIELS ET METHODES	106
3.1	ANIMAUX	106
3.2	ANTICORPS	106
3.2.1	ANTICORPS PRIMAIRES.....	106
3.2.2	ANTICORPS SECONDAIRES.....	108
3.3	ETUDE ANATOMIQUE DU CERVEAU DES SOURIS S^{-/-}.....	108
3.3.1	DOSAGE DES PROTEINES SPECIFIQUES DE COMPARTIMENTS CELLULAIRES PAR WESTERN BLOT 108	
3.3.2	PREPARATION D'ECHANTILLONS.....	108
3.3.3	ANALYSE HISTOLOGIQUE DES TRACTS MYELINISES DU CERVEAU DES SOURIS S ^{-/-} ET S ^{+/+}	111
3.3.4	MISE EN EVIDENCE DU FORNIX PAR TRAÇAGE LIPIDIQUE CHEZ LA SOURIS.....	115
3.3.5	TRAÇAGE DU FORNIX PAR INJECTION CEREBRALE STEREOTAXIQUE DE LENTIVIRUS CHEZ LA SOURIS	115
3.3.6	ANALYSE HISTOLOGIQUE DU SUBICULUM DORSAL CHEZ LA SOURIS	116
3.4	ETUDE DE LA NEUROGENESE ADULTE CHEZ LES SOURIS KO STOP.....	117

3.4.1	ETUDE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES SOUCHES ET PROGENITEURS PROLIFERANT	118
3.4.2	DOSAGE DU BDNF DANS L'HIPPOCAMPE.....	119
3.4.3	ETUDE DE LA NEUROGENESE LONG TERME ET SURVIE NEURONALE.....	120
3.4.4	ETUDE DE LA PRODUCTION DE NEURONES IMMATURES DANS L'HIPPOCAMPE.....	121
3.4.5	ETUDE DE LA MATURATION MORPHOLOGIQUE DES NEURONES IMMATURES NEOFORMES DU GYRUS DENTE PAR INFECTION RETROVIRALE.....	122
3.4.6	ANALYSE DU PATRON D'EXPRESSION DE STOP DANS LES ZONES GERMINATIVES : DETECTION DE LA β -GALACTOSIDASE PAR IMMUNOFLUORESCENCE.....	125
4	<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	<u>127</u>
4.1	PREMIERE PARTIE : ETUDE HISTOLOGIQUE ET ANATOMIQUE DU CERVEAU DES SOURIS KO STOP 127	
4.1.1	CONSEQUENCE DE L'ABSENCE DE STOP SUR LE CONTENU PROTEIQUE DU CERVEAU	129
4.1.2	ANALYSE HISTOLOGIQUE DES TRACTS MYELINISES DU CERVEAU DES SOURIS S ^{-/-}	139
4.1.3	ANALYSE HISTOLOGIQUE DU FORNIX DU CERVEAU DES SOURIS S ^{-/-}	144
4.1.4	ANALYSE DE L'INTEGRITE DU FORNIX PAR TRAÇAGE LIPIDIQUE CHEZ LES SOURIS KO STOP ...	147
4.1.5	TRAÇAGE DU FORNIX PAR INJECTION CEREBRALE STEREOTAXIQUE DE LENTIVIRUS CHEZ LES SOURIS KO STOP.....	150
4.1.6	ANALYSE DE L'INTEGRITE DES AFFERENCES DES CORPS MAMILLAIRES PAR TRAÇAGE LIPIDIQUE DES SOURIS KO STOP	154
4.1.7	ANALYSE HISTOLOGIQUE DU SUBICULUM DORSAL DISTAL CHEZ LES SOURIS SAUVAGES ET KO STOP	154
4.1.8	DISCUSSION	159
4.2	DEUXIEME PARTIE : ETUDE DE LA NEUROGENESE ADULTE CHEZ LA SOURIS KO STOP.....	165
4.2.1	LA SOURIS KO STOP, UN OUTIL POUR ETUDIER L'EXPRESSION DE STOP DANS LES ZONES DE NEUROGENESE ADULTE	166
4.2.2	ANALYSE DE LA NEUROGENESE ADULTE DU BULBE OLFACTIF CHEZ LES SOURIS KO STOP	173
4.2.3	ANALYSE DE LA NEUROGENESE ADULTE HIPPOCAMPALE CHEZ LES SOURIS KO STOP.....	175
4.2.4	DISCUSSION	190
5	<u>CONCLUSION GENERALE</u>	<u>196</u>
6	<u>BIBLIOGRAPHIE.....</u>	<u>198</u>
7	<u>ANNEXES.....</u>	<u>221</u>
7.1	TABLE DES FIGURES.....	221
7.2	TABLE DES TABLEAUX.....	223

7.3	ARTICLE 1: STOP PROTEINS CONTRIBUTE TO THE MATURATION OF THE OLFACTORY SYSTEM	
		224
7.4	ARTICLE 2: THE DELETION OF THE MICROTUBULE-ASSOCIATED STOP PROTEIN AFFECTS THE SEROTONERGIC MOUSE BRAIN NETWORK	225

Abréviations

ABC : complexe avidine-biotine
Ac I : anticorps primaire
Ac II : anticorps secondaire
AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique
A-STOP: astocyte-STOP
BDNF : brain derived neurotrophic factor
 β -gal: β -galactosidase
BO: Bulbe Olfactif
BrdU : BromodésoxyUridine
CA : Corne d'Ammon
CaMKII : kinase calcium/calmoduline dépendante de type II
CCA : cortex cingulaire antérieur
Cf : corps du fornix
CG : couche granulaire du gyrus denté
CM : couche moléculaire du gyrus denté
DCX : Doublecortine X
EGF: Epidermal Growth Factor
FGF: Fibroblast Growth Factor
COMT: catéchol-O-méthyl transférase
CPDL : cortex préfrontal dorso latéral
CPFm : cortex préfrontal médian
5-HT : sérotonine
DA : dopamine
DAB : diaminobenzidine tétrahydrochloride
DAO ou DAAO : D-amino-acid oxydase
DAT : transporteur de la dopamine
DISC1 : disrupted in schizophrenia
DSM-IV-TR : quatrième version révisée du diagnostic and statistic manual of the American psychiatric association
DTI : diffusion tensing imaging
DTNBPI : dystrobrevin-binding protein ou dysbindine
EEG : électroencéphalogramme
ECT : électroconvulsivothérapie
E-STOP : early-STOP
F : fornix
FA : fraction d'anisotropie
F-actine: filament d'actine
Fp : fornix post-commissural
F-STOP: fibroblast-STOP
GABA : acide α -aminobutyrique
GAD : glutamate décarboxylase
GAP : growth associated protein
GAT : transporteur du GABA
GLAST : glutamate/aspartate transporter
GLU : glutamate
GluR1 : Sous unité 1 du récepteur AMPA

GD : Gyrus Denté
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
iGluR : récepteur glutamatergique ionotropique
GPI : Goat Preimmun Serum
Ig: Immunoglobulines
RM : imagerie par résonance magnétique
IRMf : imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
KA : kainate
KO : knock-out
LPI : lobe pariétal inférieur
LTD : long term depression ou dépression à long terme
LTP : long term potentiation ou potentialisation à long terme
Ip : intrapéritonéale
MAO : mono-amine oxydase
MAP : microtubule associated protein ou protéine associée aux microtubules
mGluR : récepteur glutamatergique metabotropique
MT : microtubules
NAA : N-acétyl-aspartate
NAcc : noyau accumbens
NADPH-diaphorase : nicotinamide-adenosine-dinucleotide-diaphorase
NCAM : neural cell adhesion molecule
NGA : Neurogenèse Adulte
NET : norepineprine transporter ou transporteur de la noradrénaline
NF: neurofilament
NGF: nerve growth factor
NL : neuroleptique
NeuN : Neuron Nucleus protein
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NO : oxyde nitrique
NR1 : Sous unité 1 du récepteur au NMDA
NRG1 : neuroréguline 1
N-STOP: neuronal-STOP
NT: neurotrophine
O-STOP: oligodendrocyte-STOP
PBS : phosphate buffer saline ou solution de tampon phosphate
PBS T: PBS tween 20
PCP: phencyclidine
PFA : paraformaldéhyde
PPI : prepulse inhibition ou inhibition du reflexe de sursaut
PRODH : proline déshydrogénase
PSD : post synaptic density ou densité post-synaptique
RGS4: regulator of G-protein signalling 4
RMS: Rostral Migratory Stream
5-HT: sérotonine
S^{-/-} : STOP knock-out
S^{+/+} : STOP sauvage
Sc : sous-cutané
SNC : substance noire compacte
SNC : système nerveux central
STOP : stable tubule-only polypeptide

RT : Room temperature ou température ambiante
TEP : tomographie à émission de positons
TH : tyrosine hydroxylase
5-HT : sérotonine
22qDS : syndrome de délétion 22q
VGLUT : transporteur vésiculaire du glutamate
ZSG : Zone Sous Granulaire
ZSV : Zone Sous Ventriculaire

1 Introduction générale

La schizophrénie, maladie psychiatrique chronique, touche 1% de la population mondiale. C'est un syndrome physiopathologique plurifactoriel complexe, débutant souvent à l'adolescence ou chez le jeune adulte. La maladie, d'origine neurodéveloppementale, se caractérise par l'expression, chez le patient, de différents troubles comportementaux, dits positifs (hallucination, agressivité, hyperréactivité au stress...), négatifs (retrait social, apathie, émoussement affectif...) et cognitifs (troubles de la mémoire de travail, contextuelle et déficience de l'apprentissage cognitif...). Si la composante génétique de la schizophrénie est clairement établie, les hypothèses les plus récentes impliquent un grand nombre de gènes dans la cause génétique de la schizophrénie et donc l'expression de symptômes très variée selon le gène muté (mutation très pénétrante d'un gène donné). On peut ainsi parler « des schizophrénies » plutôt que de la schizophrénie. Malgré cette diversité d'origines, tant au niveau comportemental qu'anatomique ou biologique, on observe (quelque soit le gène muté) une convergence des altérations avec des consensus qui émergent. Par exemple, de manière consensuelle une dérégulation de la neurotransmission glutamatergique et dopaminergique est observée chez les patients schizophrènes. De la même manière, au niveau anatomique, les données récentes rapportent très souvent une réduction du volume cérébral et un élargissement des ventricules latéraux. Cette réduction du volume cérébral semble être associée à une altération du neuropil (prolongements neuronaux) et de la substance blanche.

Au cours de la dernière décennie, plusieurs modèles animaux « génétiques », utiles pour l'étude de la schizophrénie, ont été générés (mutation d'un gène de susceptibilité pour la schizophrénie). Ces modèles animaux récapitulent certains troubles comportementaux, anatomiques ou neurochimiques, observés dans la schizophrénie, avec des spécificités reliées au gène muté. L'utilisation de tels modèles animaux a permis de réaliser des avancées très importantes dans les connaissances des bases cellulaires et moléculaires neurodéveloppementales à l'origine de la schizophrénie.

C'est dans ce contexte que se situent mes travaux. A partir d'un modèle animal (mutation du gène *Map6* ; souris STOP KO ; $S^{-/-}$) qui récapitule certains symptômes de la schizophrénie et plus particulièrement une diminution du volume cérébral, j'ai tenté de déterminer les relations entre la diminution du volume cérébral et la biologie cellulaire des neurones *in situ* puis tenté de comprendre les événements cellulaires et moléculaires à l'origine de cette diminution de volume.

Mon laboratoire de thèse travaille sur la physiopathologie du cytosquelette et notamment sur les protéines associées aux microtubules, les protéines STOP (Stable Tubulin Only Polypeptide). Les protéines STOP sont principalement exprimées dans les neurones, l'isoforme neuronale adulte étant enrichie au niveau des microtubules axonaux et dendritiques stables. *In vitro*, les protéines STOP sont capables de stabiliser les microtubules exposés au froid ou à des agents dépolymérisants (nocodazole...). Les protéines STOP sont également capables de lier l'actine et après lipidation d'interagir avec des membranes comme celles de l'appareil de Golgi ou celles des vésicules golgiennes neuronales. Des animaux déficients pour le gène STOP (aussi appelé Map6) ont été produites, souris STOP KO ($S^{-/-}$).

Hormis un manque de stabilité au froid des microtubules, aucun phénotype morphologique apparent n'a, au préalable, été caractérisé dans le cerveau des souris $S^{-/-}$. Par contre, ces souris présentent de nombreuses anomalies comportementales apparentées à la schizophrénie (troubles positifs, négatifs et cognitifs) liées à des dysfonctionnements de la transmission neuronale et de la plasticité synaptique. Les neuroleptiques et antipsychotiques utilisés comme traitement dans la schizophrénie atténuent les dysfonctionnements synaptiques et comportementaux des souris. Ce modèle animal exprime donc un large panel de troubles anatomiques, fonctionnels et comportementaux associés à la schizophrénie.

Plus récemment, une étude anatomique détaillée du cerveau des souris STOP KO a été entreprise en utilisant des souris homogènes génétiquement (fond génétique hybride homogène : C57Bl6/129SvPas 50%/50%). Ces souris présentent très peu de variabilité anatomique interne et permettent de clairement identifier des différences anatomiques reliées au génotype (sauvage vs STOP KO). En utilisant ces souris, une diminution du volume cérébral chez les souris $S^{-/-}$ de 15% a été observée ainsi qu'un élargissement des ventricules latéraux (notamment en utilisant l'imagerie anatomique par résonance magnétique). Ces données sont en cohérence avec les données obtenues chez les patients schizophrènes et l'étude des causes cellulaires et moléculaires de cette réduction de volume cérébral dans le modèle animal $S^{-/-}$ devrait permettre de proposer des hypothèses mécanistiques pour la mise en place des défauts anatomiques observés chez l'homme.

Un des axes de ma thèse a été d'appréhender l'origine de la diminution du volume cérébral des souris $S^{-/-}$. Afin de savoir si un compartiment cellulaire cérébral était spécifiquement altéré, nous avons étudié et comparé, par Western blot quantitatif, la quantité d'un large panel de marqueurs protéiques spécifiques de compartiments cellulaires

cérébraux (nucléaires, gliaux, neuronaux, myéliniques, neuritiques et synaptiques) à partir d'homogénats de cerveaux de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$. Nous avons ainsi démontré que la réduction de volume cérébral chez les souris $S^{-/-}$ ne s'accompagnait pas d'une perte cellulaire massive, et plus particulièrement de neurones, mais était associée à une forte diminution des compartiments myéliniques, axonaux et synaptiques.

Ces résultats nous ont poussés à analyser, ensuite, chez les souris $S^{-/-}$, l'intégrité des tracts myélinisés du système limbique qui est particulièrement affecté chez les schizophrènes. Ainsi, grâce à des techniques d'histologie et de morphométrie, nous avons montré que le diamètre de certains tracts du système limbique (corps calleux, cingulum, faisceau mamillo-thalamique) était fortement réduite chez les souris $S^{-/-}$. L'observation majeure de cette étude a été la mise en évidence, chez les souris $S^{-/-}$, de l'absence de la partie post-commissurale du fornix, faisceau principalement constitué des efférences de l'hippocampe qui projettent dans les corps mamillaires. De plus, l'utilisation d'une technique de traçage lipidique du fornix par le Dil a pu confirmer la disparition brutale de la partie post-commissurale du fornix chez les souris $S^{-/-}$. Des études récentes par RMN convergent pour indiquer que le fornix est fortement altéré chez les patients schizophrènes.

Afin de mieux comprendre la disparition brutale du fornix, nous avons développé des techniques de traçage lentiviral stéréotaxique pour pouvoir analyser l'aspect et le cheminement des fibres du fornix chez les souris $S^{-/-}$. L'infection lentivirale de GFP nous a permis de mieux caractériser cette zone de rupture et de montrer la dispersion et la désorganisation des axones du fornix au niveau post-commissural chez les souris $S^{-/-}$. Nous avons pu aussi mettre en évidence que seulement un nombre très restreint d'axones du fornix connectent les corps mamillaires chez les souris $S^{-/-}$. Cette observation a été confirmée par l'implantation de Dil au niveau des corps mamillaires, zone de projection du fornix. Les résultats de cette première partie nous ont permis de montrer clairement que le cerveau des souris $S^{-/-}$ souffrait d'un déficit axonal majeur et de troubles de la connectivité neuronale.

Par ailleurs, notre laboratoire a montré une altération du réseau sérotoninergique chez les souris $S^{-/-}$. Le nombre de projections sérotoninergiques visualisées par le transporteur de la sérotonine SERT chute de façon spectaculaire dans plusieurs zones du cerveau, dont l'hippocampe et la zone sous ventriculaire. Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si la neurogenèse adulte pouvait être altérée dans les souris $S^{-/-}$.

En effet, la neurogenèse hippocampale adulte est déficiente aussi bien chez les malades dépressifs que schizophrènes. Les antidépresseurs de la famille des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine stimulent fortement la neurogenèse adulte hippocampale. De

plus, le processus de neurogenèse adulte est directement régulé par l'activité synaptique des neurones environnants et semble aussi jouer un rôle dans les processus d'apprentissage et de mémorisation hippocampal-dépendant, eux aussi altérés dans la schizophrénie et chez la souris $S^{-/-}$. Nous avons alors analysé les différentes étapes du processus et ce, dans les deux zones du cerveau créant de nouveaux neurones à l'âge adulte : la zone sous ventriculaire/bulbe olfactif ainsi que l'hippocampe.

Par, ailleurs, la neurogenèse adulte est la continuité des processus de la neurogenèse neurodéveloppementale. Par conséquent, les étapes cellulaires aboutissant à la naissance de neurones chez l'adulte semblent équivalentes à celles durant la neurogenèse neurodéveloppementale. Ce processus chez l'adulte peut être aussi un outil permettant d'analyser les étapes de différenciation et de maturation neuronale *in vivo*. La souris $S^{-/-}$ souffrant d'anomalies de la connectivité neuronale et plus particulièrement présentant un déficit axonal, l'analyse des différentes étapes de maturation neuronale à travers le processus de neurogenèse adulte représente alors une alternative préliminaire moins lourde à l'utilisation d'embryons de souris.

Ainsi, nous avons tout d'abord analysé et comparé chez les souris sauvages et $S^{-/-}$, la cytogenèse et la survie des neurones néoformés dans les deux zones germinatives du cerveau. Le marquage par la BrdU (immunohistochimie) des cellules néosynthétisées et la technique de marquage des neurones néoformés par la BrdU long terme, nous a permis de conclure que chez la souris $S^{-/-}$, la neurogenèse hippocampale était spécifiquement et progressivement altérée. Grâce à des immunofluorescences directes de la β -galactosidase (gène rapporteur sous l'influence du promoteur de STOP dans les souris $S^{-/-}$) et des marqueurs spécifiques des types cellulaires impliqués dans la neurogenèse adulte, nous avons pu montrer une forte association entre l'expression de la protéine STOP et l'altération des étapes de différenciation morphologique des neurones immatures néoformés dans l'hippocampe. L'absence de défauts de la neurogenèse sous ventriculaire, qui elle, est dépourvue de protéine STOP, renforce l'hypothèse du rôle direct de la protéine STOP dans les processus de maturation des neurones en grain du gyrus denté.

L'analyse du nombre de neuroblastes et neurones immatures du gyrus denté, par immunohistochimie nous a permis de montrer que ce pool de cellules était réduit de 40% chez les souris $S^{-/-}$. Nous avons ainsi démontré une altération progressive du processus de neurogenèse adulte chez la souris $S^{-/-}$ aboutissant à une diminution massive de 55% du nombre de neurones néoformés. Sachant que la protéine STOP apparaît dans les neurones en cours de maturation, l'effet cumulatif suggère un rôle intrinsèque des protéines STOP dans la différenciation des neurones des cellules en grain du gyrus denté de l'hippocampe.

L'analyse morphologique de l'arborisation dendritique des neurones du gyrus denté en cours de maturation nous a permis de mettre en évidence une morphologie dendritique des neurones immatures des souris $S^{-/-}$ très différente de celle des souris $S^{+/+}$. En effet, il semblerait que les neurones immatures des souris $S^{-/-}$ aient un dendrite primaire plus long et un arbre dendritique plus branché que les neurones de souris $S^{+/+}$.

Nous avons alors, dans un deuxième temps, focalisé notre étude sur les différentes étapes de différenciation et maturation morphologique des neurones néoformés du gyrus denté, en développant des techniques de traçage rétroviral, infectant spécifiquement les cellules souches neurales du gyrus denté. Après 4 semaines d'infection nous avons analysé le nombre de neurones néoformés (GFP positifs) immatures (DCX positif) et matures (NeuN positif). Les résultats préliminaires indiquent une réduction du nombre de neurones immatures chez les souris $S^{-/-}$ suggérant une maturation prématurée des neurones néoformés du gyrus denté.

Les travaux d'analyse de la cytogénèse et la neurogénèse long terme du bulbe olfactif et du gyrus denté de l'hippocampe, ainsi que l'analyse du système sérotoninergique chez les souris $S^{-/-}$ ont été soumis à publication dans la revue scientifique Journal of Neurochemistry : **« The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network V Fournet*, M Jany*, V Fabre, F Chali, D Orsal, A Schweitzer, A Andrieux. F Messanvi, B Giros, M Hamon, L Lanfumey, JC Deloulme and MP Martres.* Equal contribution (voir annexe 2).**

Cette étude a donc permis de conforter le statut de modèle animal de schizophrénie des souris $S^{-/-}$ en mettant en évidence dans un modèle murin, un phénotype cellulaire majeur retrouvé aussi chez les patients schizophrènes humains. Dans ce contexte, il apparaît que la souris $S^{-/-}$ est un bon modèle expérimental pour déterminer d'une part, les bases cellulaires de la perte de masse cérébrale et de la neurogénèse adulte associées aux symptômes schizophréniques et d'autre part, pour mieux appréhender le rôle des protéines STOP dans l'établissement des connectivités neuronales.

2 Rappels bibliographiques

2.1 La schizophrénie, un ensemble de pathologies

2.1.1 Caractérisation psychiatrique des schizophrénies

2.1.1.1 Présentation épidémiologique

'Schizophrénie' provient du grec « σχίζειν » ("schizein") signifiant fractionnement et « φρήν » ("phrèn") désignant l'esprit. Cette « coupure de l'esprit » caractérise plus une perte de contact avec la réalité plutôt qu'une « double personnalité ». Le terme schizophrénie est associé à la plus commune des psychoses et touche 1% de la population mondiale. La caractérisation clinique de la psychiatrie ayant évolué durant ces dernières années, il ne faut plus parler, désormais, de la schizophrénie, mais des schizophrénies. Ces pathologies sont les plus difficiles à diagnostiquer (Eaton et al., 2007) du fait de la multitude d'associations de critères comportementaux qui peuvent leur être associées. De nos jours, l'absence de marqueurs pathogénomiques empêche toujours la mise en place d'un profil diagnostique stable et surtout précoce.

Le début de la maladie reste difficile à définir à cause des nombreux types de manifestation (premiers troubles psychiques, premiers symptômes positifs, première hospitalisation...), mais apparaît le plus souvent chez le jeune adulte. Les communautés scientifiques et médicales s'accordent à définir le début de la maladie comme l'apparition des symptômes psychotiques marqués nécessitant une hospitalisation (critères de type A du DSM-IV-TR : *Diagnostic and Statistical Manual of mental disorders - IV^{ème} édition- Texte Révisé*). La survenue des troubles est décalée entre les deux sexes : la schizophrénie débute entre 15 et 24 ans chez l'homme et 25 et 34 ans chez la femme (Jablensky, 2000).

2.1.1.2 Découverte et caractérisation de la schizophrénie

Ce n'est qu'au milieu du 19^{ème} siècle que la schizophrénie fut reconnue en tant que pathologie unitaire : Griesinger, un psychiatre allemand avait décrit certains états schizoïdes actuels comme une aggravation d'un trouble psychotique chronique. Heiker (1871) et Kahlbaum (1874) décrivirent ensuite l'hébéphrénie et la catatonie (deux symptômes de nos jours reconnus comme étant rattachés à la schizophrénie) comme des états distinctifs de la détérioration mentale (démence). A partir de cette époque et jusqu'au milieu du 20^{ème} siècle, les limites de la caractérisation clinique de la schizophrénie ont été longuement débattues entre 3 grands psychiatres : Kraepelin, Bleuler et Schneider. La conceptualisation actuelle de

cette pathologie dérive en majeure partie de leurs travaux et repose sur des critères descriptifs objectifs et rigoureux :

- **La chronicité de Kraepelin** : apparition d'une partie des symptômes aux alentours de l'adolescence qui s'accroît sans rémission et qui sera agrémentée par d'autres symptômes plus tardifs suivant eux, un décours temporel rémission/rechute progressif.

- **Les symptômes négatifs de Bleuler** : relâchement des associations cognitives, autisme, perturbations affectives et ambivalence

- **Les 11 symptômes positifs de Schneider** : (voir DSM-IV-TR et paragraphe suivant).

Ces symptômes psychotiques doivent être présents au minimum un mois et ne doivent ni être associés à des troubles de l'humeur, ni à de la toxicomanie ou bien des pathologies cérébrales pouvant mimer certains troubles psychotiques (tumeur).

A ce jour et compte tenu des connaissances accumulées, il est probable que la schizophrénie soit la conséquence de l'association de processus physiopathologiques perturbant le développement cérébral et de l'intervention de facteurs étiologiques (Tandon et al., 2008).

2.1.1.3 Une symptomatologie comportementale complexe

- **Diversité des troubles comportementaux**

Il existe 3 dimensions de troubles dans la schizophrénie : cognitifs désorganisés, positifs et négatifs. Ces symptômes peuvent être présents de façon isolée ou associée. Une évolution de plus de six mois de la symptomatologie permet de proposer un diagnostic qui nécessite au paravant, l'élimination d'une pathologie cérébrale annexe pouvant produire le même type de trouble. Nous allons décrire brièvement ces différents types selon le DSM-IV-TR.

Troubles cognitifs désorganisés

Les troubles cognitifs sont souvent les premiers symptômes qui apparaissent chez l'individu schizophrène, entraînant des difficultés de socialisation. Ils persisteront plus longtemps que les symptômes aigus.

* Troubles de la mémoire épisodique et de travail. La mémoire autobiographique en est affectée et la mémoire de travail fonctionne plus difficilement : il oublie plusieurs moments de son histoire personnelle. Il est incapable d'effectuer plusieurs tâches en même temps en se souvenant du niveau de progression de chacune d'elles.

* Troubles des fonctions exécutives. Le schizophrène a de la difficulté à conceptualiser les gestes nécessaires à la réalisation d'une tâche, à anticiper les conséquences. Il manque de planification et d'organisation dans les séquences d'actions nécessaires à la réalisation d'un but et manque également de flexibilité, de discernement, de vérification et d'autocritique.

Symptômes positifs

Ils sont dits 'aigus' et se manifestent habituellement entre 17 et 23 ans chez les hommes et 21 et 27 ans chez les femmes. Ils sont dits « positifs » car ils représentent une rupture avec l'état antérieur.

* Hallucinations : elles sont le plus souvent auditives, mais parfois aussi olfactives ou tactiles et plus rarement visuelles.

* Délires : ce sont des erreurs de jugement logique : paranoïa, persécutions, intuitions, mégalomanie, un morcellement corporel, accompagnés le plus souvent par un discours désorganisé tant dans l'élocution que la langue (mots incompréhensibles ou inventés).

* Syndrome d'automatisme mental associant un écho de la pensée, des pensées imposées ou un vol de la pensée (syndrome de l'influence).

* un comportement de catatonie : conservation des attitudes, négativisme, mutisme, posture de repli.

Symptômes négatifs

Ils sont dits "déficitaires" et s'apparentent à un manque ou une absence de comportements spontanés, attendus.

* Isolement, retrait social qui amène l'individu à se couper progressivement de la réalité

* Difficulté de conversation (*Alogie*) : le schizophrène ne trouvant plus ses mots, donne des réponses brèves et évasives et ne réussit plus à communiquer ses idées ou ses émotions.

* Apathie, perte d'énergie. Ce trouble peut conduire au manque exagéré d'hygiène, de condition vestimentaire en public, une perte de l'initiative (apragmatisme) et de l'achèvement des tâches journalières, et de l'attention souvent interprétés par l'entourage comme un manque de volonté et de la paresse.

* L'émoussement affectif et l'athymormie : Peu à peu le schizophrène perd la capacité de ressentir les émotions et l'expression faciale qui en découle : le visage du schizophrène

devient inexpressif, ses inflexions vocales diminuent, ses mouvements sont moins spontanés, ses gestes, moins démonstratifs.

- ***Evolution temporelle des troubles comportementaux***

La schizophrénie suit une trajectoire séquentielle qui peut être caractérisée par 4 différentes phases évolutives (Tandon et al., 2009) :

La phase prémorbide (0 à 15 ans)

Dans son enfance, le schizophrène présente un tableau clinique normal, malgré quelques légères perturbations motrices sociales et/ou cognitives subtiles et non spécifiques.

La phase promorbide (15 à 20 ans)

L'adolescent présente les premiers signes précurseurs de la maladie : comportements étranges, déclin cognitif, et expression des premiers symptômes négatifs à minima.

La phase symptomatique (20 à 50 ans)

Cette phase débute par l'apparition du premier épisode psychotique (symptômes positifs ; notamment hallucination) qui nécessitera une première hospitalisation. Cette phase suggère l'entrée dans la schizophrénie. L'individu va osciller entre phases de rémission et de rechute, sans retrouver son comportement antérieur.

La phase de rémission

Amélioration des symptômes positifs, la plupart du temps en faveur d'une prise en charge clinique. Il peut s'agir d'une rémission complète ou d'une rémission avec persistance de symptômes résiduels.

2.1.1.4 Définition clinique en relation avec les autres pathologies psychiatriques

Les formes cliniques de la schizophrénie (schizophrénie paranoïde, schizophrénie désorganisée ou hébéphrénique, schizophrénie catatonique, schizophrénie indifférenciée et schizophrénie résiduelle) sont nombreuses et font preuve d'une grande hétérogénéité tant au niveau symptomatique qu'au niveau de leur sensibilité aux traitements. Selon le DMS-IV-TR il est possible qu'un patient puisse osciller entre différentes formes de schizophrénie au cours de l'évolution de sa maladie, ce qui fait d'elle une maladie très compliquée à diagnostiquer (selon l'âge auquel le patient développe la maladie) mais aussi à traiter et à stabiliser (selon la variabilité temporelle des différentes formes qu'il présentera tout au long de sa maladie).

Il est important de noter que les différents types de troubles (dimensions) décrites dans la schizophrénie peuvent se retrouver dans d'autres pathologies psychiatriques (figure 1). La psychiatrie est en train de mettre à jour ses critères de caractérisation des pathologies s'y rapportant en jouant sur une approche dimensionnelle plutôt que catégorielle comme elle le faisait auparavant (schizophrénie, dépression...). Ainsi la psychiatrie va permettre la description du patient en termes de pourcentage et de sévérité d'une ou plusieurs dimensions au sein de chaque pathologie psychiatrique. De manière intéressante, les trois dimensions majeures présentes dans la schizophrénie (positive, négative, désorganisée) se retrouvent également chez des sujets présentant un trouble de la personnalité schizotypique et chez des sujets non malades. L'approche psychiatrique actuellement admise propose un modèle à 5 dimensions (figure 1). Ainsi, le statut psychique des patients est évalué selon cinq dimensions: positive, négative, désorganisée, excitation et dépression/anxiété (El Yazaji et al., 2002). Dans cette approche dimensionnelle, ces cinq dimensions exprimées à des intensités différentes d'un sujet à l'autre permettent de modéliser très simplement la diversité des formes cliniques traditionnelles de schizophrénie. Cette nouvelle analyse constitue donc une approche intéressante du continuum postulé entre les psychoses. Enfin, l'approche dimensionnelle à cinq facteurs amène l'ouverture d'une nouvelle voie de prospection où les processus neurobiologiques impliqués dans chaque dimension (zone cérébrale, voie de signalisation...) seront recherchés et permettra ainsi de proposer des approches thérapeutiques ciblées et plus adaptées.

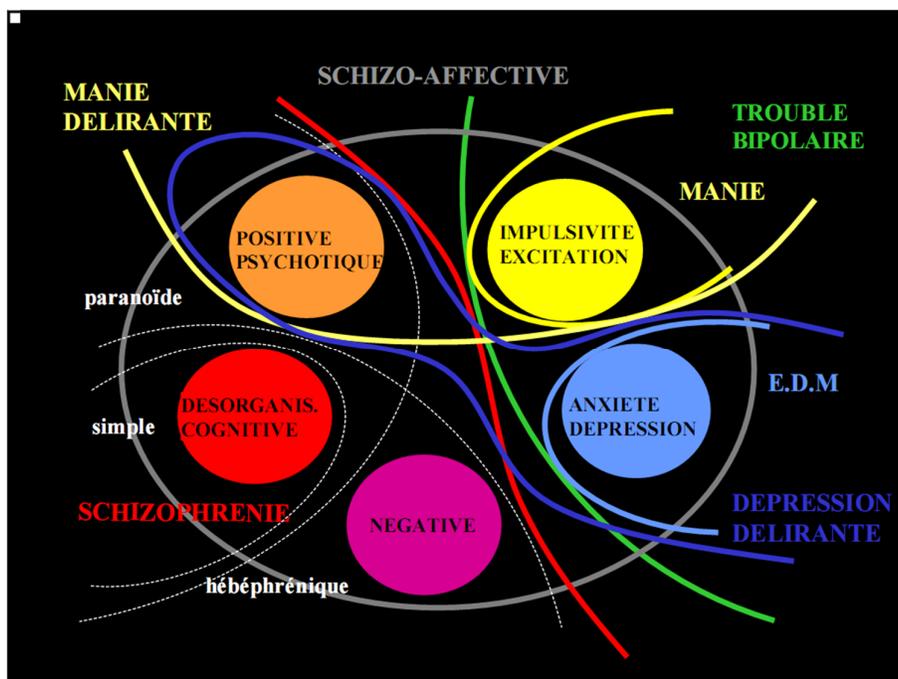


Figure 1 : relations entre les dimensions cliniques et les diagnostics catégoriels au sein du continuum psychotique

Les traits pleins indiquent les dimensions retrouvées dans chaque trouble psychiatrique. Les dimensions dont la couleur est identique à celle d'une pathologie représentent les dimensions majeures de la pathologie en question : par exemple, l'impulsivité/excitation est toujours retrouvée dans la manie et la manie délirante. Les traits en pointillés indiquent les dimensions retrouvées dans les différentes schizophrénies : par exemple, dans la schizophrénie paranoïde, nous retrouvons à la fois la dimension positive psychotique et la dimension désorganisée cognitive. EDM : Episode Dépressif Majeur. (Saoud et al., 2000)

2.1.2 La schizophrénie, une maladie du neurodéveloppement

2.1.2.1 Etiologie : plusieurs hypothèses

La schizophrénie reste une maladie difficile à diagnostiquer. Malgré les spectaculaires avancées concernant l'élaboration du tableau clinique, les processus physiopathologiques à l'origine de sa mise en place demeurent encore mal définis et leur connaissance limitée. Kraepelin, un des psychiatres à l'origine de la caractérisation clinique de la schizophrénie, avait suggéré l'existence d'un processus dégénératif progressif de type démentiel dans cette pathologie, conduisant à une aggravation clinique inexorable et systématique des patients.

Actuellement, un nombre important d'arguments vont plutôt dans le sens d'une hypothèse neurodéveloppementale (Marenco and Weinberger, 2000; Church et al., 2002). Cette hypothèse propose un enchaînement d'événements séquentiels : 1) on naît vulnérable du fait d'interactions entre facteurs génétiques et facteurs environnementaux prénataux, 2) on développe un trouble schizophrénique par l'intervention de facteurs environnementaux

plus tardifs (prise de toxiques par exemple) et/ou de facteurs endogènes, notamment à l'occasion de modifications hormonales liées à la maturation pubertaire.

Pour autant, cette modélisation ne correspond qu'à l'une des hypothèses physiopathologiques de la schizophrénie, à côté d'autres données en faveur d'aspects neurodégénératifs, ou de modèles focalisés sur différents systèmes neurobiologiques (hypothèses dopaminergique, glutamatergique, etc.).

La plupart des facteurs environnementaux décrits comme associés à une vulnérabilité à la schizophrénie surviennent au cours de la période prénatale (3^{ème} trimestre de grossesse) -notamment lors des périodes critiques de mise en place ou de maturation des différentes régions du système nerveux (figure 2) – c'est-à-dire bien avant l'émergence des symptômes cliniques apparaissant à l'adolescence ou au début de l'âge adulte. Néanmoins certains facteurs environnementaux peuvent venir s'ajouter plus tardivement aux facteurs génétiques et ce, juste avant l'émergence des symptômes cliniques.

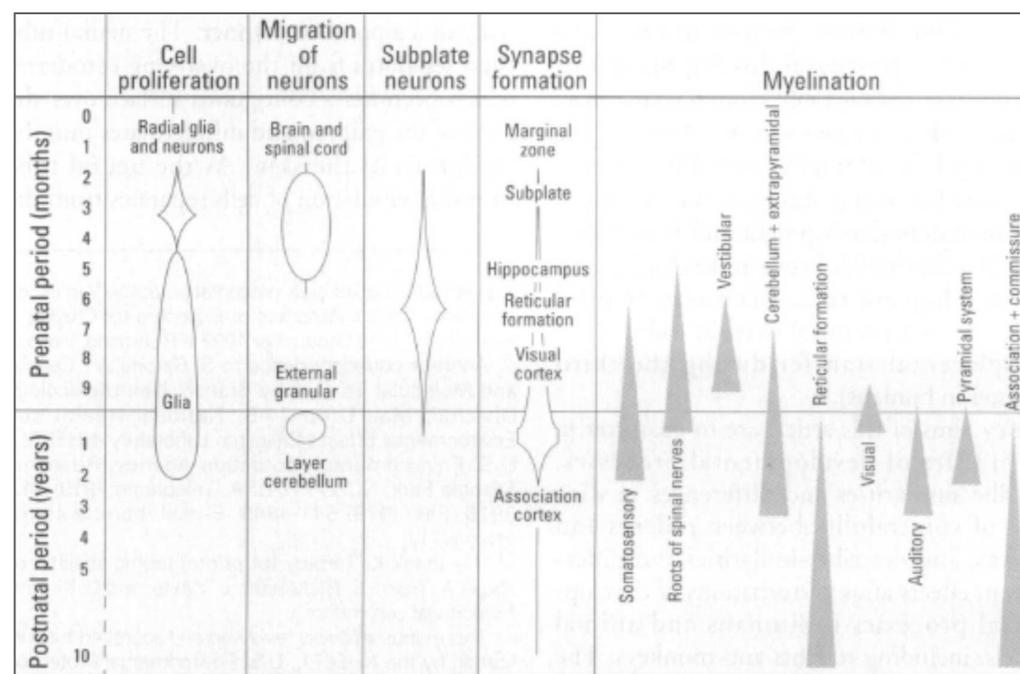


Figure 2 : Comparaison des délais de déroulement des différents processus neurodéveloppementaux humains (Rice and Barone, 2000).

La période prénatale est représentée en mois alors que la période postnatale est divisée en années.

2.1.2.2 Facteurs génétiques de risque précoces

En interaction avec une vulnérabilité génétique, les agressions environnementales précoces représentent des facteurs qui peuvent accroître potentiellement le risque de développer une schizophrénie (Tsuang, 2000), cette vulnérabilité génétique pouvant

contribuer à augmenter la sensibilité de certains sujets aux effets délétères induits par les facteurs environnementaux.

En psychiatrie, les recherches actuelles sont orientées vers la caractérisation des endophénotypes qui sont des traits (cliniques, biochimiques ou cognitifs) associés à l'expression de facteurs de vulnérabilité génétique de la maladie chez des sujets sains, mais ayant des parents atteints. Les endophénotypes doivent répondre aux critères suivants : ils doivent être présents avant le début de la maladie et être héréditaires. Si le marqueur est un trait de vulnérabilité à la maladie, l'identification des gènes liés à l'expression de cet endophénotype aidera à la reconnaissance des gènes de susceptibilité à la maladie. L'identification d'endophénotypes pourrait se révéler utile à l'identification de gènes de susceptibilité et ainsi renforcer l'hypothèse que la schizophrénie serait la résultante de l'interaction de plusieurs de ces marqueurs de vulnérabilité. Cette nouvelle approche permettrait donc d'une part de décomposer une entité clinique complexe en plusieurs composantes ayant chacune un déterminisme génétique propre et, d'autre part, d'envisager les maladies mentales comme des entités clinique résultant de l'interaction de différents facteurs de vulnérabilité, ce qui rendrait compte de leur hétérogénéité et permettrait également d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques plus focalisées, voire préventives.

Le mode de transmission de la schizophrénie demeure encore inconnu, mais il a été clairement montré que le risque est plus élevé de développer la maladie pour un enfant dont au moins un de ses parents, grands-parents ou membre de la famille a développé la schizophrénie. Malheureusement, ni le nombre de gènes, ni leur localisation chromosomique et leur mode de transmission n'est à ce jour connu (Raux et al., 2002; Gourion et al., 2003). Le support polygénique en interaction avec l'environnement, l'hétérogénéité du phénotype clinique et la complexité des systèmes neurobiologiques impliqués constituent donc autant de limitations dans l'approche génétique moléculaire des schizophrénies.

Les études de type gène candidat (un seul gène est ciblé en fonction de son rôle présumé) ont montré l'implication possible de gènes ayant un rôle dans le neurodéveloppement et la plasticité neuronale : Reeline, BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), UFDL-1 (*Ubiquitin Fusion-Degradation gene*), NT₃ (*neurotrophin-3*), la dysbindine (*dystrobrevin-binding protein1*), la neuréguline (*NRG1*) ainsi que les gènes associés à la myélinisation. Récemment, les résultats concernant le BDNF sont particulièrement prometteurs. Ce facteur neurotrophique est impliqué dans la survie et la plasticité neuronales. Son rôle essentiel dans les phénomènes de mémoire épisodique

hippocampe-dépendant est aujourd'hui bien montré, ainsi que son impact sur la modulation de récepteurs postsynaptiques glutamatergiques et dopaminergiques (Egan et al., 2003).

D'autres gènes définis comme candidats à la schizophrénie ont un rôle dans la neurotransmission glutamatergique et dopaminergique : RGS4 (*regulator of G-protein signalling 4*), CHRNA7 (*récepteur alpha 7 nicotinique*), DAOA (*D-amino-acid oxidase activator*) (Schwab and Wildenauer, 2009).

De nombreuses études ont montré l'implication élevée du gène DISC1 (*disrupted in schizophrenia 1*) dans la schizophrénie due à une translocation entre les chromosomes 1 et 11 (Blackwood et al., 2001), qui induit une modification de la séquence nucléotidique de ce gène. Alors que la délétion totale chez la souris est létale, la délétion conditionnée de DISC1 provoque l'apparition d'un phénotype schizoïde associée à des problèmes de maturation et migration neuronales (Duan et al., 2007). Le produit du gène DISC1 est capable de s'associer à de nombreuses protéines du cytosquelette et semble impliqué dans la fonction microtubulaire en assurant la migration cellulaire, la croissance des neurites et l'adressage des récepteurs à la membrane (Roberts, 2007).

Les méta-analyses des études de criblage de génome entier (avec de très nombreux marqueurs, sans hypothèse a priori sur un gène donné) désignent plusieurs régions d'intérêt sur les régions chromosomiques 8p, 13 q, 22q (Badner and Gershon, 2002). Mais ces régions sont vastes et regroupent des dizaines voir plusieurs centaines de gènes, et les études restent difficiles à répliquer.

Une donnée récente concerne la découverte de la prévalence chez 1 à 3% des patients schizophrènes d'une microdélétion du chromosome 22q11. De façon générale, cette microdélétion concerne 1 naissance sur 4000 et représente la deuxième anomalie chromosomique en fréquence après la trisomie 21. Cette délétion survient dans 80% des cas de schizophrénie, probablement du fait de troubles de la spermatogenèse (on sait par ailleurs que l'âge paternel avancé est un facteur de risque probable dans la schizophrénie). Le syndrome vélo-cardio-facial, lié à la microdélétion du 22q, peut entraîner un syndrome polymalformatif : une dysmorphie faciale, des anomalies cardiovasculaires, des malformations rénales et, chez un tiers des sujets, un syndrome schizophrénique. Cette comorbidité entre syndrome vélo-cardio-facial et schizophrénie génère un intérêt considérable parce que d'une part, c'est la première démonstration qu'un syndrome génétique fréquent et bien identifié peut générer un phénotype schizophrénique ; d'autre part car les études du criblage du génome avaient attiré l'attention sur la région 22q11. La piste actuelle consiste donc à cibler des gènes candidats de cette région d'intérêt. Ce syndrome dont l'expression est précoce au cours du développement implique le ciblage de gènes du

développement situés dans cette région tels que UFD₁L et PRODH (*PROlin DesHydrogenase*) (De Luca et al., 2001; Jacquet et al., 2002).

2.1.2.3 Facteurs endogènes de risque tardifs

Comme décrit auparavant, la maladie survient souvent à la fin de l'adolescence ou au début de l'âge adulte, bien que des troubles subtils et non spécifiques soient présents bien avant : durant l'enfance, certaines fonctions mnésiques et exécutives commencent à se dégrader et des troubles comportementaux apparaissent (Walker et al., 1999; Silverstein et al., 2003). Ce phénomène s'amplifiera jusqu'à l'âge adulte et semble donc se corrélérer avec les processus de maturation neuronale tardive : remaniement synaptique et renforts des connectivités neuronales se déroulant du début de l'adolescence jusqu'à l'âge adulte. L'intervention de facteurs exogènes et endogènes durant l'adolescence semble nécessaire à l'expression des premiers symptômes schizoïdes.

Alors que la puberté se caractérise par une augmentation massive de la sécrétion d'hormones gonadiques, l'adolescence correspond à une période plus étendue où des processus maturationnels spécifiques et un remodelage des circuits neuronaux permettent une maturation cognitive, émotionnelle et sociale intenses. Le cerveau est un des organes cible durant ces deux phases.

Bien que la majeure partie des structures cérébrales se mettent en place lors de l'embryogenèse, le cerveau subit des étapes de maturations post-natales et pré-pubères. En effet, des processus de myélinisation, de synaptogenèse, de renforcement des connectivités neuronales et du remodelage de la substance grise surviennent jusqu'à l'âge de 25 ans chez l'homme (Rice and Barone, 2000). Du fait que l'enfance et l'adolescence soient des périodes d'apprentissage, d'éveil et de mémorisation intense, le cerveau subit à la fois des transformations subtiles générales mais aussi au niveau cellulaire. Ainsi, des études ont montré que le volume de la substance grise de l'hippocampe, l'amygdale et des structures corticales augmente pendant l'enfance et diminue ensuite lors de l'adolescence. Le volume de ces régions se stabilise généralement vers 25 ans (Giedd et al., 1996; Gogtay et al., 2004). Il semble que les variations de volume de la substance grise soient la conséquence d'un élagage synaptique intense associé à des processus de neurogenèse, d'apoptose et de bourgeonnement neuritique transitoires. Seules les connections les plus fortes et les plus utilisées seront maintenues (Huttenlocher and Dabholkar, 1997; Cunningham et al., 2002). L'ensemble de ces mécanismes permettrait d'optimiser le traitement des informations en éliminant les connections synaptiques les moins sollicitées et en assurant le développement des nouvelles connections, en tenant compte des expériences cognitives et sociales vécues par l'individu. Ce processus concerne surtout le système limbique, particulièrement impliqué

dans l'intégration des comportements émotionnels et des processus cognitifs qui sont fortement exacerbés à l'adolescence (Paus et al., 2001).

Dans la schizophrénie, des déficiences dans les processus de maturations tardives pourraient provoquer ou révéler des troubles cérébraux responsables de l'apparition des premiers symptômes psychotiques.

2.1.2.4 Conclusion

L'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie est aujourd'hui confortée par l'existence d'un faisceau d'arguments cliniques, neuropsychologiques, biologiques et neuropathologiques (figure 3).

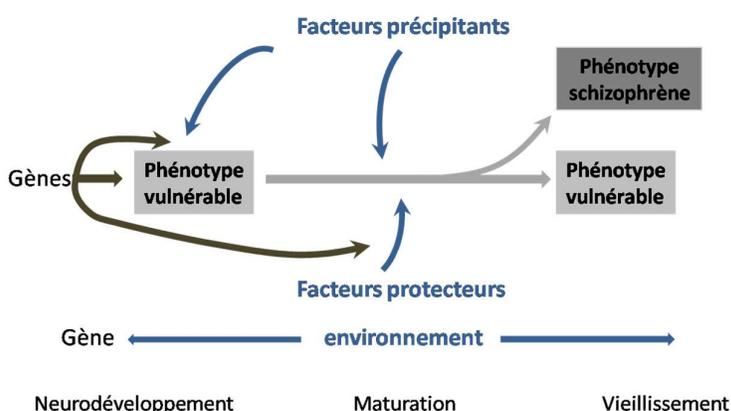


Figure 3 : Schéma récapitulatif des mécanismes étiopathogéniques impliqués dans l'origine neurodéveloppementale et dans l'évolution temporelle de la schizophrénie.

Ce qui fait la particularité et la complexité de la schizophrénie en termes de modélisation physiopathologique est justement lié à cette particularité évolutive, en plusieurs séquences temporelles, avec passage d'un phénotype vulnérable vers un phénotype pathologique. Ainsi, d'autres étapes ultérieures, en termes de maturation neuronale et/ou de vieillissement cellulaire semblent également impliquées et méritent d'être explorées. Il manque surtout, un modèle physiopathologique intégratif clairement validé permettant de rendre compte des nombreuses anomalies phénotypiques du patient schizophrène.

2.1.3 Symptomatologie cérébrale et intégrative de la schizophrénie

2.1.3.1 Etude longitudinale des troubles anatomiques

La schizophrénie est une maladie difficile à diagnostiquer du fait de la diversité des formes cliniques du premier épisode psychotique mais aussi par la multitude de troubles anatomiques que les patients peuvent présenter. Les études menées sur la caractérisation

des troubles fonctionnels cérébraux présents chez l'individu schizophrène ont eu un essor important ces dernières décennies. L'avancée technologique dans l'imagerie cérébrale nous a permis, ces dernières années, de mettre en évidence des anomalies anatomiques cérébrales et ainsi de conforter l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie (Venkatasubramanian, 2007; Haukvik et al., 2009).

- **Face et corps : troubles anatomiques mineurs**

Dès 1885, Kraepelin faisait état de ces anomalies morphologiques chez les patients atteints de « *dementia praecox* ». Ces anomalies, infracliniques, sont fréquentes dans la population générale et plus encore chez les patients schizophrènes (McGrath et al., 2002). Ces signes dysmorphiques modérés sont liés au développement de l'ectoderme et des crêtes neurales, l'ectoderme étant le feuillet embryonnaire à l'origine de la formation du système nerveux central. La constitution de ces anomalies morphologiques mineures est contemporaine d'étapes du développement comprises entre le premier et le deuxième trimestre de grossesse. Elles sont également des marqueurs de vulnérabilité rencontrés avec une prévalence plus importante que dans la population générale chez les apparentés sains de patients schizophrènes.

- **Histologie du cerveau : troubles anatomiques majeurs**

A l'époque de Kraepelin, une altération des neurones des couches profondes du cortex et une perte cellulaire notable (sans gliose réactionnelle associée) avaient été décelées au niveau microscopique.

Au cours du XXème siècle, les recherches concernant les troubles histologiques anatomiques du cerveau dans la schizophrénie sont restées vaines. Petit à petit, le manque de pertinence de l'étude anatomopathologique laissa place au dogme du caractère purement psychopathologique de la schizophrénie. C'est en 1976 que Johnstone réussit, par densitométrie cérébrale, à rapporter la dilatation des ventricules cérébraux chez une vingtaine de patients schizophrènes (Johnstone et al., 1976). Cette même technique a permis de révéler la diminution du volume cérébral total moyen (Wright et al., 2000). L'apparition et l'amélioration des techniques d'imageries fonctionnelles et cérébrales - imagerie à résonnance magnétique (IRM), imagerie à tenseur de diffusion (DTI)/anisotropie - ont permis de dresser un tableau assez large des troubles anatomiques associés aux déficits fonctionnels cérébraux des schizophrènes (figure 4) (Eisenberg and Berman). En revanche, il y eu beaucoup de contradictions dans les résultats médiée par les différences dans le nombre de patients utilisés, le sexe, l'âge du premier épisode psychotique et du type de médication ou de substances élicites qu'ils prenaient. Néanmoins il est possible de dresser

un tableau clinique des différentes altérations anatomiques cérébrales présentes chez les schizophrènes. Nous décrivons les défauts anatomiques et fonctionnels de 7 régions cérébrales interconnectées qui présentent à la fois des différences anatomiques mais aussi fonctionnelles dans la schizophrénie.

Circuit	Functional connectivity findings during executive function in schizophrenia	Additional findings	Putative involved risk genes	Risk-variant-associated circuit findings		
Frontocingulate	Reduced	<i>Reduced frontocingulate D2-binding correlation</i>	<i>NRG1</i>	<i>Reduced anterior cingulate, inferior frontal activation during sentence completion</i>		
		<i>Reduced cingulum bundle fractional anisotropy</i>				
Frontoparietal	Reduced (dorsal prefrontal–parietal) Increased (ventral prefrontal–parietal)	<i>Reduced frontoparietal resting glucose metabolism correlation</i>	<i>COMT</i>	<i>Reduced dorsal prefrontal–parietal connectivity during working memory</i>		
		<i>Reduced superior longitudinal fasciculus fractional anisotropy</i>			<i>RGS4</i>	<i>Increased ventral prefrontal–parietal connectivity during working memory</i>
						<i>Reduced dorsal prefrontal–parietal connectivity during working memory</i>
						<i>Reduced dorsal prefrontal–parietal connectivity during working memory</i>
						<i>Increased ventral prefrontal–parietal connectivity during working memory</i>
Frontotemporal	Increased	<i>Reduced fornix fractional anisotropy</i>	<i>COMT</i>	<i>Increased frontotemporal connectivity during recognition memory</i>		
		<i>Reduced cingulum bundle fractional anisotropy</i>			<i>ZNF804A</i>	<i>Increased frontotemporal connectivity during working memory</i>
						<i>Increased hippocampal activation during working memory</i>
						<i>Increased prefrontal activation during working memory</i>
Frontostriatal	Increased	<i>Reduced anterior limb of internal capsule fractional anisotropy</i>	<i>PPP1R1B</i>	<i>Increased frontostriatal connectivity during working memory</i>		
		<i>Dorsolateral prefrontal N-acetylaspartate reductions correlate with exaggerated amphetamine-induced striatal dopamine release</i>			<i>PRODH</i>	<i>Increased frontostriatal connectivity during working memory</i>
						<i>Reduced prefrontal and caudate volumes</i>
						<i>Reduced anterior limb of internal capsule fractional anisotropy</i>
Thalamofrontal	Mixed	<i>Reduced superior occipitofrontal fasciculus fractional anisotropy</i>	<i>NRG1</i>	<i>Reduced anterior limb of internal capsule fractional anisotropy</i>		
		<i>Reduced anterior limb of internal capsule fractional anisotropy</i>				

Figure 4 : Tableau récapitulatif des altérations des fonctions exécutives associées aux défauts anatomiques cérébraux dans la schizophrénie humaine (d'après Eisenberg et Berman).

Le cortex frontal et ses structures associées

De nombreuses études ont émis l'hypothèse que la dysfonction du cortex frontal pouvait être à l'origine de la physiopathologie de la schizophrénie (Elvevag and Goldberg, 2000). Ce fut alors une des premières régions d'intérêt. Cette région regroupe les cortex dorsolatéral, ventrolatéral, et cingulaire antérieur et est impliquée dans la projection dans le futur, l'organisation et la résolution des problèmes, la fluence verbale et la mémoire de travail (Tsuchida and Fellows, 2009).

Cortex Préfrontal Dorsolatéral (CPDL)

C'est la région centrale de la gestion des processus cognitifs. Chez les patients schizophrènes, le volume du CPDL semble réduit, mais pas autant que celui du lobe temporal médian (Nopoulos et al., 1995; Fornito et al., 2009). Aucune étude n'a permis, cependant, de mettre en évidence des processus dégénératifs (par l'intermédiaire de gliose associée) ou lésionnels associés à cette diminution de volume. On dénote, à l'aide d'études post-mortem de cerveaux schizophrènes, des perturbations au niveau des cellules excitatrices (dopaminergiques) : augmentation de la densité des cellules pyramidales accompagnée d'une diminution de leur couche dendritique (Selemon et al., 1995, 1998; Glantz and Lewis, 2000) ce qui fait penser à une diminution du neuropil, plus qu'à une perte cellulaire. Cette diminution pourrait être secondaire à une perte d'afférences excitatrices corticocorticales et thalamocorticales, exerçant un effet trophique sur ces neurones ou à des altérations ces connexions frontostriatales. Une sous partie des neurones inhibiteurs GABAergiques (neurones en chandelier) semble diminuée et sous exprimer les enzymes de synthèse du GABA (Hashimoto et al.). Ce neurotransmetteur inhibiteur est connu pour réguler l'activité des neurones dopaminergiques. Une diminution de nombre d'oligodendrocytes, ayant un effet trophique sur les neurones, pourrait également contribuer à la diminution des volumes neuronaux (Bernstein et al., 2009). Les études de PET scan (Positron Emission Tomography) sur les récepteurs dopaminergiques diffèrent selon l'élément radioactif utilisé mais reflètent en tout cas des effets compensatoires à la diminution des afférences dopaminergiques du midbrain observée dans le CPDL (Bertolino et al., 2000; Abi-Dargham et al., 2002). Il semblerait aussi avoir des connections aberrantes entre le CPDL et des structures impliquées dans la fonction exécutive (Eisenberg and Berman). Des anomalies de la substance blanche ont aussi été démontrés (Schlosser et al., 2007).

Le cortex frontal ventrolatéral lui, ne semble pas présenter de défauts histologiques majeurs. Cependant, le fait qu'il ne soit pas en sous activité chez les schizophrènes

(notamment lors de tests exécutifs ou de mémorisation) met en évidence des défauts de connexions fines entre les cortex ventro et dorsolatéraux.

Cortex cingulaire antérieur (CCA)

Comme dans le CPDL, les études sur des cerveaux post-mortem ont mis en évidence de nombreuses altérations neuronales du CCA, une structure paralimbique se situant dans les lobes frontaux. Les afférences glutamatergiques « verticales » des couches II et III a semblent augmentées, les neurones de ces couches par ailleurs exprimeraient de façon anormale des protéines cytosquelettiques, synaptiques et métaboliques (Benes et al., 1992; Clark et al., 2006). La densité cellulaire de la couche IV serait réduite ainsi que le nombre de neurones gabaergiques exprimant GAD 67 (Benes et al., 2001; Torrey et al., 2005). Ces résultats corrèlent bien avec les diminutions de volume, de matière grise observées en imagerie à résonance magnétique (Goldstein et al., 1999; Rusch et al., 2007). La réduction d'activité des récepteurs D₂ et D₃ met elle, en évidence un défaut de connectivité entre le CCA et d'autres structures comme le thalamus et le cortex pariétal (Yasuno et al., 2005).

Le lobe pariétal inférieur (LPI)

Des réductions de volume de la substance grise du LPI ont été rapportées chez les patients schizophrènes lors de plusieurs études (Eisenberg and Berman). Cette diminution peut être amplifiée chez les patients présentant des hallucinations passives et des troubles cognitifs exacerbés (Zhou et al., 2007). Souvent, la présence d'hallucinations corrèle bien avec l'exagération des troubles cognitifs LPI dépendants. Cette réduction de volume est intéressante et attire de nombreux groupes à en décèler les origines, puisque qu'elle se retrouve chez les enfants à devenir schizophrène et qu'elle est d'autant plus grande que les individus développent précocement la maladie (Thompson et al., 2001).

Le LPI, fortement connecté au CPDL, joue un rôle important dans les processus d'exécution et de mémoire exécutive (mémoire de travail). La schizophrénie à dominance négative (individus présentant plus de troubles négatifs que positifs) est généralement associée à une réduction de la substance blanche au niveau du LPI (Zetsche et al., 2008). L'étude par DTI a permis de mettre en évidence une altération myélinique du faisceau supérieur longitudinal, tract neuronal reliant les aires pariétales aux aires frontales (Shergill et al., 2007).

Le cortex temporal médian

Les hallucinations auditives se retrouvant très souvent dans la schizophrénie, le cortex temporal médian, composé, en partie des cortex auditifs primaire et associatif, a été très étudié. Le volume de cette région est largement diminué chez les individus schizophrènes,

notamment celui de la couche 3 profonde (Shi, 2007). Cependant les études concernant la réduction de la densité neuronale et gliale demeurent contradictoires. Les cellules du cortex temporal des schizophrènes semblent également plus vulnérables à l'apoptose, bien que celle-ci ne se manifeste qu'au début de la maladie (Glantz et al., 2006).

Le système limbique

Formation hippocampale

L'hippocampe a été incriminé dans la physiopathologie de la schizophrénie beaucoup plus tard que le cortex préfrontal. Néanmoins, un intérêt majeur lui a été porté, en premier lieu pour des raisons cliniques. En effet, l'altération fonctionnelle de cette région par un processus vasculaire, inflammatoire, dégénératif (maladie d'Alzheimer) ou irritatif (épilepsie temporale) peut générer des symptômes apparentés à ceux de la schizophrénie (Bage et al., 2004). Par ailleurs, l'hippocampe joue un rôle important dans la mémorisation des informations et l'apprentissage, ainsi que dans les processus émotionnels. Or, ces domaines étant atteints dans la schizophrénie, on peut émettre l'hypothèse que l'altération de cette région participerait à la mise en place de la schizophrénie. La formation hippocampale est située à la face interne du lobe temporal. Elle entretient des rapports anatomiques étroits avec l'amygdale, le ventricule latéral, et la fente de Bichat, qui la sépare du pédoncule cérébral. Elle se compose du gyrus denté (GD), de la corne d'Ammon (CA₁ à CA₃) et du subiculum. Elle est séparée par le sillon de l'hippocampe de la circonvolution de l'hippocampe ou gyrus parahippocampique, à la partie antérieure duquel est situé le cortex entorhinal. Cette dernière région reçoit des afférences provenant des aires corticales associatives des quatre lobes cérébraux et parvenant aux couches 2 et 3 du cortex entorhinal. Des fibres efférentes quittent la CA₁, le subiculum et le cortex entorhinal en direction des aires corticales associatives frontale, temporale et pariétale, de l'hypothalamus, de l'amygdale et de la partie ventrale du subiculum.

Selon les études en imagerie par résonance magnétique, le volume de la région hippocampique est réduit en moyenne de 4 à 5% chez les schizophrènes, (Honea et al., 2005) et ce très précocement. Ces arguments vont à l'encontre d'un caractère dégénératif comme rencontré dans la maladie d'Alzheimer. Il semblerait que cette perte de volume concerne plus particulièrement la partie antérieure de l'hippocampe et la substance blanche (fornix-fimbria) suggérant que les voies de communication seraient touchées (Heckers, 2001). La perte de volume prédirait le degré d'inactivation du cortex préfrontal, renforçant l'hypothèse de l'implication des circuits fronto- limbique dans les troubles cognitifs présents dans la schizophrénie (Weinberger et al., 1992). Récemment, les techniques d'anisotropie ont permis de mettre en évidence une réduction massive de la substance

blanche du fornix et du faisceau longitudinal inférieur (Ashtari et al., 2007; Fitzsimmons et al., 2009). Le fornix est un faisceau d'axones myélinisés important qui relie les neurones du subiculum aux neurones des corps mamillaires. L'altération de ces faisceaux suggère un défaut d'intégrité des connexions bidirectionnelles de l'hippocampe, mais aussi des connexions entre ce dernier et le CPDL.

Des études ont aussi montré une réduction de la taille des cellules pyramidales de la CA associée à une réduction de la densité des épines dendritiques (d'où la réduction d'une protéine impliquée dans l'architecture des épines : la spinophiline, (Dwork et al., 2005)). La quantité de protéines associées aux microtubules est aussi diminuée. Au niveau du gyrus denté, la densité des fibres moussues (axones des neurones granulaires du gyrus denté projetant sur les neurones de la CA₃), le taux d'expression de protéines synaptiques, mais aussi l'expression des partenaires de DISC1 (FEZ1, NUDEL, LIS1) semblent diminués (Rastogi et al., 2009). Ces neurones présentent aussi une dysfonction des récepteurs NMDA et de l'expression de leur sous unité (augmentation de l'expression de la sous unité NR_{2B} et diminution de l'expression des sous unités NR₁) (Eisenberg and Berman, 2010). Une perturbation de la neuréguline 1 réduit la transmission et la plasticité glutamatergique (sous tendant les processus de mémorisation) au niveau hippocampique (Harrison, 2007).

Les couches 2 et 3 du cortex entorhinal présentent un placement neuronal aberrant et une perte de leur organisation classique en îlots. La taille des corps cellulaires est aussi diminuée. Néanmoins, d'autres études n'ont pas pu reproduire ces résultats.

Il semblerait que la réduction de volume de la région temporale interne (incluant la formation hippocampale) soit fortement corrélée aux mauvaises performances en mémoire verbale, à la diminution de la capacité d'abstraction et à la symptomatologie positive retrouvés dans la schizophrénie (Harrison, 2004).

Amygdale

Le nombre total de neurones y est réduit. Etant donné les projections de l'amygdale sur le striatum et la substance noire, ces anomalies pourraient participer à la mise en place des altérations dopaminergiques observées dans la schizophrénie (Kreczmanski et al., 2007). Toutefois, ce phénomène serait la conséquence des traitements antipsychotiques. D'autres auteurs ne retrouvent pas ces altérations et estiment que les connexions amygdalopréfrontales sont préservées (Fallon, 1988).

La régulation des gènes codant pour des protéines impliquées dans les fonctions présynaptiques et la myélinisation semblent altérées (Weidenhofer et al., 2006).

Corps mamillaires

Cette structure représente la zone de projection du fornix dont l'intégrité est altérée chez les patients schizophrènes. Elle fait partie de l'hypothalamus antérieur et est liée aux processus de mémoire de travail. Une seule étude montre une diminution du nombre de neurones en chandelier gabaergiques projetant sur le thalamus antérieur (Bernstein et al., 2007).

Les ganglions de la base/Noyaux gris centraux

Striatum

Les études concernant le nombre ou la densité des neurones striataux demeurent contradictoires. En revanche, les études histologiques post-mortem ont permis de mettre en évidence une augmentation de la densité des épines dendritiques, une diminution de la quantité des mitochondries axonales, une réduction de la machinerie de recapture du GABA et du glutamate ainsi qu'une diminution de la population neuronale cholinergique (Eisenberg and Berman). En revanche, les concentrations de dopamine semblent plus élevées et corréler avec une surpopulation des récepteurs dopaminergiques D_{2/3} et D₄. Cette hyperfonctionnalité dopaminergique subtile est accompagnée d'une expression et d'un stockage exacerbé de protéines présynaptiques. Ces résultats ont été confirmés par la technique PETscan fonctionnel *in vivo* et retranscrivent bien l'hypothèse hyperdopaminergique dans le striatum chez les patients schizophrènes. Les études d'imageries fonctionnelles ont permis de comprendre que la suractivation de l'activité striatale permettait peut être de contrer l'hypoactivation du CPDL retrouvée chez les schizophrènes.

Putamen

Les interneurones nitrinergiques du putamen semblent moins nombreux et morphologiquement anormaux. Ces neurones, par l'intermédiaire du NO (monoxyde d'azote) -un neurotransmetteur inhibant l'activité des neurones dopaminergiques- influenceraient l'activité des neurones dopaminergiques striataux (Fritzen et al., 2007).

Thalamus

L'étude *in vivo* du cerveau des patients schizophrènes a permis de mettre en évidence une réduction du volume du noyau médiodorsal du thalamus (Konick and Friedman, 2001).

Les études postmortem ont permis d'observer, au niveau des noyaux médiodorsal et centromedian, une diminution du nombre de neurones, de l'expression de récepteurs

glutamatergiques (NMDA, AMPA, Kaïnate) et des transporteurs glutamatergiques (Ibrahim et al., 2000; Smith et al., 2001a, b). Les études fonctionnelles cérébrales ont mis en évidence une altération des connectivités entre le noyau médiodorsal et à la fois le CPDL et le CTL (Mitelman et al., 2005) retrouvée aussi en anisotropie. Ces résultats suggèrent une altération structurale des connexions thalamo-préfrontales et thalamo-cingulaires chez les patients schizophrènes, qui peuvent être à l'origine des déficiences dans les processus exécutifs, et notamment dans la fluence verbale. On ne peut cependant pas écarter le rôle de certaines comorbidités fréquentes chez les schizophrènes (dont l'addiction à l'alcool, responsable d'altérations thalamiques) et des effets secondaires du traitement antipsychotique.

Le cervelet

Le cervelet a été impliqué dans la physiopathologie de la schizophrénie par Andreasen (Andreasen et al., 1998) via l'hypothèse d'une « dissymétrie cognitive ». Le volume de matière grise cérébelleuse pourrait être corrélé à la sévérité des hallucinations, mais cette hypothèse reste controversée. Il n'y aurait pas de différence dans la taille et le nombre de neurones du cervelet. Dans le vermis antérieur par contre, l'activité des neurones serait diminuée ainsi que la taille et la densité des cellules de Purkinje. L'expression de protéines synaptiques, dans ces derniers, serait fortement réduite (Picard et al., 2008). Cependant, les effets d'une comorbidité alcoolique sur cette région ne peuvent être écartés.

Anomalies de la gyrification corticale et de la latéralisation hémisphérique

L'index de gyrification correspond au degré de plicature de la matière grise. Chez les sujets schizophrènes, il semble être diminué dans les aires latérales et augmenté dans les régions dorsales (Sallet et al., 2003). Des anomalies de la gyrification corticale chez les sujets schizophrènes vont dans le sens des hypothèses d'altération de la connectivité synaptique corticocorticale d'origine neurodéveloppementale.

La latéralisation est un phénomène qui se déroule lors de la phase de puberté (enfance/adolescence). Ce processus consiste en une réversion de l'activité des connexions inter-régionales du cerveau de l'hémisphère droit en faveur de l'hémisphère gauche. Ainsi les connexions de l'hémisphère gauche sont plus renforcées à la fois au niveau anatomique (plus d'axones et gaine de myéline plus épaisse au niveau des tracts) et fonctionnel (Saugstad, 1999). Ce défaut de latéralisation gauche observé chez l'individu schizophrène dénote bien à la fois des défauts de myélinisation et synaptiques.

Conclusion

L'ensemble de ces arguments présentés dans cette partie est révélateur de troubles discrets de la connectivité neuronale au sein de la formation hippocampale/cortex temporal

et du CPDL qui seraient dus à des perturbations de la synaptogenèse et de la migration neuronale. Il semblerait que ces changements subtils conduiraient à une grande variété de manifestations cliniques. La formation des couches laminaires de ces structures et l'établissement de réseaux neuronaux fonctionnels sont des phénomènes complexes qui impliquent plusieurs étapes de prolifération, de différenciation et de migration neuronales qui surviennent au cours du deuxième trimestre de gestation (Weinberger and Lipska, 1995; Bunney and Bunney, 2000). Par ailleurs il pourrait se produire un excès d'élimination des synapses à l'adolescence. Cette période de vie est caractérisée chez le sujet sain par un important élagage synaptique. L'étude de divers marqueurs synaptiques comme la synaptophysine (protéine présynaptique terminale) indique une réduction du nombre de synapses ou, tout du moins, un dysfonctionnement synaptique dans la schizophrénie (Sweet et al.). Un excès d'apoptose synaptique, consécutif à une altération des ratios d'expression des gènes de l'apoptose, pourrait entraîner un remodelage synaptique pathologique. Ce phénomène semblerait transitoirement présent au début de la maladie (Chen et al., 2009). Certains gènes impliqués dans le relargage des neurotransmetteurs sont sous-exprimés, rendant la synapse moins active, donc plus vulnérable à une élimination. Ces constatations sont compatibles avec l'hypothèse d'une altération fonctionnelle des circuits neuronaux via une atteinte de la connectivité synaptique d'origine neurodéveloppementale.

La nature et la subtilité des anomalies histologiques décrites chez les patients schizophrènes sont donc en faveur d'un processus primaire précoce qui interviendrait pendant une période critique du développement cérébral. Bien que ces données permettent de décrire un tableau très complet de la pathologie corticale observée dans la schizophrénie, il est important de retenir que les perturbations décrites dans ce chapitre ne sont pas retrouvées chez tous les patients schizophrènes, comme s'il n'existait pas de signature neuropathologique unique dans cette maladie.

2.1.3.2 Altérations fonctionnelles cérébrales majeures

Les altérations fonctionnelles supérieures présentées par les patients schizophrènes semblent provenir d'un déséquilibre entre les neurotransmissions gabaergique, glutamatergique, sérotoninergique et dopaminergique.

- **Hyperdopaminergie**

L'implication de la dopamine dans la physiopathologie et le traitement de la schizophrénie a fait l'objet de nombreux travaux depuis 50 ans.

La première hypothèse de la physiopathologie de la schizophrénie, basée sur des arguments pharmacologique était en faveur d'une transmission dopaminergique exacerbée.

En effet, l'apparition des neuroleptiques dans le traitement de la schizophrénie a permis une avancée spectaculaire au niveau de la recherche. L'amélioration des symptômes psychotiques par l'administration de neuroleptiques, qui partagent tous la caractéristique d'être des antagonistes des récepteurs dopaminergiques D₂, constitue également un argument supplémentaire en faveur de l'hypothèse dopaminergique. Ce constat est d'autant plus marquant depuis qu'il a été montré que l'efficacité clinique des neuroleptiques corrélait fortement avec leur capacité à bloquer les récepteurs D₂ (Delay et al., 1952; Creese et al., 1976). On sait par ailleurs, que les drogues capables d'augmenter la libération de dopamine (amphétamine, cocaïne) ont des effets schizomimétiques. La susceptibilité des patients schizophrènes aux psychostimulants a d'ailleurs conduit certains auteurs à proposer la schizophrénie comme résultat d'un processus de sensibilisation endogène du système mésolimbique (Lieberman et al., 1997; Laruelle, 2000). Il s'agirait d'une boucle de contrôle positive dans laquelle une exacerbation permanente de la libération de dopamine conduirait à l'augmentation progressive de l'activité du système dopaminergique mésolimbique. Cette théorie pourrait expliquer la transition progressive de la phase promorbide « silencieuse » vers une symptomatologie clinique active.

La prise en compte des différentes modalités de la transmission dopaminergique, et des anomalies fonctionnelles de la connexion entre certaines régions corticales et entre les régions corticales et limbiques observées chez les schizophrènes, ont conduit à une nouvelle hypothèse. Dans cette nouvelle hypothèse, les symptômes positifs de la schizophrénie sont associés à une hyperactivité épisodique de la transmission dopaminergique sous-corticale (Grace, 1991) et l'expression des symptômes négatifs et cognitifs induits par une diminution de l'activité corticale.

Les systèmes de neurotransmission travaillant en synergie, la dopamine ne peut pas à elle seule être responsable de la mise en place des troubles fonctionnels cérébraux observés dans la schizophrénie.

- ***Hypoglutamatergie***

Le premier argument en faveur de l'hypothèse d'un hypofonctionnement glutamatergique dans la schizophrénie, repose sur les effets comportementaux provoqués par l'administration d'antagonistes non-compétitifs des récepteurs NMDA tels que la phencyclidine (PCP) ou la kétamine. En effet, ces produits provoquent des psychoses de type schizophrénique chez des individus sains et déclenchent des symptômes psychotiques chez les patients schizophrènes en rémission (Newcomer et al., 1999). Ces symptômes incluent une hyperlocomotion, des comportements stéréotypiques, des déficits cognitifs, des perturbations de l'intégration sensorimotrice, ainsi que des troubles des interactions sociales.

Ces résultats ont été appuyés par le fait que l'injection d'une faible dose de kétamine chez des sujets sains pouvait entraîner l'apparition de symptômes négatifs, des déficits cognitifs et des symptômes positifs partiels (Krystal et al., 1994).

L'implication de la neurotransmission glutamatergique a été confirmée par les études histologiques concernant les récepteurs glutamatergiques que nous avons exposés dans le chapitre précédent (chapitre 2.1.3).

- ***Hypogabaergie***

Les résultats des études concernant la transmission GABAergique suggère un hypofonctionnement d'une sous population d'interneurones GABAergiques (Chapitre 2.1.3) : les cellules en chandelier, au niveau du CPDL et de l'hippocampe. De part leurs synapses au niveau des segments initiaux d'axones des neurones pyramidaux de ces régions, les neurones GABA contrôlent l'activité oscillatoire de ces réseaux neuronaux. Il semble que des modifications post-synaptiques entraînent une augmentation de la transmission GABAergique, ce qui serait pour certains auteurs, une conséquence de la diminution initiale (Nyiri et al., 2001). Ces perturbations de la neurotransmission GABA corticale et hippocampique participent, sans aucun doute, aux troubles cognitifs observés chez les patients schizophrènes.

- ***Neurotransmission sérotoninergique***

Plusieurs éléments suggèrent l'implication du système sérotoninergique dans la schizophrénie :

- L'existence d'interactions fonctionnelles entre la dopamine et la sérotonine. En effet, les neurones des noyaux du raphé médian dorsal (région où se situent les neurones sérotoninergiques) innervent les neurones dopaminergiques de la substance noire. Ils projettent aussi au niveau des régions de terminaisons dopaminergiques telles que le caudé-putamen, le noyau accumbens, le CPDL et l'hippocampe (Hornung, 2003). Il existe donc un support anatomique à l'implication de la transmission sérotoninergique dans la schizophrénie. La transmission sérotoninergique semblerait inhiber la transmission dopaminergique.

- Les modifications au niveau de l'expression des récepteurs sérotoninergiques.

L'implication de la sérotonine (5-HT) dans l'efficacité des neuroleptiques atypiques utilisés dans la schizophrénie. Meltzer a suggéré que la plus grande efficacité clinique des neuroleptiques atypiques reposerait sur leurs propriétés pharmacologiques plus variées et notamment sur leur action antagoniste vis-à-vis des récepteurs 5-HT_{2A}. Cette propriété

faciliterait la libération de dopamine au niveau cortical et serait donc responsable de l'amélioration de certains symptômes cognitifs (Meltzer, 1991). Enfin il a été montré qu'au niveau du SNC, la 5-HT influence la morphologie neuronale et gliale ainsi que la connectivité et le fonctionnement synaptique, au cours du développement embryonnaire mais également tout au long de la vie. Il a été suggéré que ce rôle trophique de la 5-HT pourrait être perturbé chez les patients schizophrènes, mais pour le moment, aucune donnée directe n'a été apportée.

- **Conclusion**

Pour résumer et de façon très schématique, une hyperactivité dopaminergique sous-corticale serait responsable des symptômes positifs tandis qu'une hypoactivité corticale provoquerait les symptômes négatifs. Un déséquilibre cortical et hippocampique au niveau des transmissions glutamatergiques et GABAergique pourrait, lui, jouer un rôle dans la genèse des symptômes cognitifs. Enfin, un dysfonctionnement de la transmission sérotoninergique interviendrait en amont des troubles de la transmission dopaminergique.

2.2 Du cytosquelette neuronal aux schizophrénies : il y a-t-il un lien ?

2.2.1 Le cytosquelette neuronal

L'intégrité d'un organisme vivant nécessite l'activité coordonnée des cellules qui le composent. Cette activité est possible grâce à des processus de communication intercellulaire présents dans deux grands systèmes : le système hormonal (communication humorale) et le système nerveux, qui transmet l'information au moyen de prolongements cellulaires. Les neurones, cellules spécialisées et fortement polarisées d'un point de vue morphologique et fonctionnel, et les cellules gliales constituent les unités fonctionnelles du système nerveux. Le développement et le fonctionnement des cellules neuronales sont tributaires d'éléments architecturaux internes permettant d'établir et de maintenir ces particularités morphologiques. L'architecture des neurones est établie, comme dans les autres cellules eucaryotes, par les éléments du cytosquelette. De façon générale, le cytosquelette maintient la forme et la polarité des cellules et permet l'ancrage et le transport de différents composants à l'intérieur de la cellule. Le cytosquelette neuronal se compose de trois types principaux d'éléments : les microfilaments d'actine, les neurofilaments ou filaments intermédiaires et les microtubules. Malgré leurs différences de taille, de localisation et de fonction, les composants du cytosquelette sont tous assemblés de la même manière :

chaque type de fibre est assemblé à partir d'unités relativement petites qui sont polymérisées pour former de longues chaînes linéaires.

2.2.1.1 Les microfilaments d'actine

Dans des conditions physiologiques, les monomères d'actine globulaire (actine G) polymérisent afin de former une structure fibrillaire appelée actine filamenteuse (actine F). Ces microfilaments, présents dans tout le neurone, sont concentrés particulièrement dans les neurites. La modification de la polymérisation du réseau d'actine est à l'origine des changements de morphologie neuronale. En effet, ce réseau est impliqué dans la stabilité et la motilité des épines dendritiques (Fischer et al., 1998) et des cônes de croissance axonaux (Tanaka and Sabry, 1995). Ainsi, lors de la croissance axonale, les filaments d'actine sont surtout présents à la périphérie et dans la zone de transition des cônes de croissance sous forme de maille ou de paquets polarisés (figure 5). Ces filaments, sous forme de paquets, sont les principaux composants des extensions du cône de croissance (lamellipodes et filopodes). La régulation de la dynamique de polymérisation de l'actine dans les extensions du cône de croissance confère une très grande motilité à ce réseau et permet l'exploration et le guidage du cône de croissance jusqu'à sa cible (Dent and Gertler, 2003).

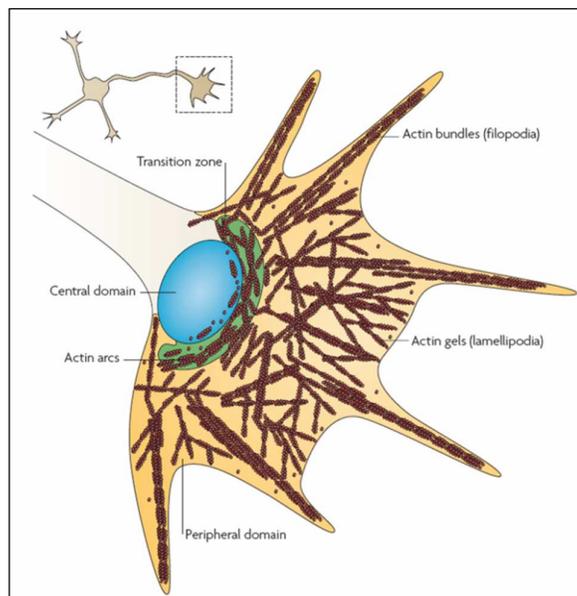


Figure 5 : Différents réseaux d'actine présents dans les cônes de croissance neuronaux (Pak et al., 2008).

Le domaine central du cône de croissance ("Central domain" représenté en bleu) n'est pas investi par des architectures d'actine. Le domaine transitoire du cône ("Transition zone" représenté en vert) contient des arcs d'actine ("Actin arcs"). Le domaine périphérique ("Peripheral domain") renferme dans sa zone lamellipodiale des gels d'actine ("Actin gels") et dans ses filopodes des câbles d'actine ("Actin bundles").

2.2.1.2 Les neurofilaments

Les filaments intermédiaires ou neurofilaments (NF) sont des hétéropolymères constitués de protéines fibreuses (Fuchs and Weber, 1994; Herrmann and Aebi, 2000). Les principaux neurofilaments présents dans les neurones matures sont composés de trois sous-unités : NF 200 kiloDaltons (kDa), NF 150 kDa, NF 68 kDa (Lee and Cleveland, 1996).

Les NF sont largement exprimés dans le système nerveux et sont particulièrement abondants et interconnectés dans les axones de gros calibre où ils s'orientent de manière parallèle. Le nombre et la composition en NF dans l'axone sont déterminants pour l'établissement du calibre axonal qui lui-même régule la vitesse de conduction de l'influx nerveux (Ohara et al., 1993; Eyer and Peterson, 1994; Zhu et al., 1997; Garcia et al., 2003). Les NF 200 kDa sont largement phosphorylés *in vivo*, ceux contenus dans l'axone étant normalement plus phosphorylés que ceux du corps cellulaire ou des dendrites (Lee et al., 1987). Les processus de phosphorylation et de déphosphorylation des NF régulent leur assemblage (Carden et al., 1985; Nixon, 1993), leur interaction avec les autres composants du cytosquelette ainsi que leur transport dans l'axone (Lewis and Nixon, 1988). Chez les humains, une dérégulation de ces modifications entraîne un processus d'agrégation de NF, responsable du développement des maladies neurodégénératives, comme la Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS) ou l'Amyotrophie Spinale (SMA) (Strong, 2004; Petzold et al., 2005; Xiao et al., 2006).

2.2.1.3 Les microtubules

Les microtubules sont des polymères cytoplasmiques essentiels aux cellules eucaryotes, avec des fonctions variées, de la mitose au transport intracellulaire, de la motilité à la morphogenèse cellulaire. Les fonctions des microtubules dépendent en grande partie de leur comportement dynamique et de leurs interactions avec les effecteurs protéiques. Dans les neurones, les dendrites et l'axone contiennent des faisceaux denses de microtubules qui s'étendent sur toute leur longueur. Ces microtubules sont essentiels à l'élaboration de l'architecture interne nécessaire à la croissance et au maintien des extensions axodendritiques et exercent un rôle crucial dans la régulation du transport d'organelles.

- **Structure des microtubules**

L'élément protéique composant les microtubules est la tubuline dont il existe plusieurs isotopes (α , β , γ , δ , ϵ , ζ). L'unité structurale de base des microtubules est l'hétérodimère de tubuline α , β . Les dimères de tubuline s'assemblent, les uns à la suite des autres, pour former des protofilaments, qui s'associent latéralement dans une structure creuse, polarisée et cylindrique appelée microtubule (figure 6). Ce sont des tubes creux de 25 nm de diamètre,

de longueur variable de 5 à 50 μm selon les situations et les types cellulaires. L'association en hétérodimères est réalisée grâce à des co-facteurs qui les capturent et les stabilisent séquentiellement avant leur assemblage. (Tian et al., 1997). La polarité fonctionnelle du protofilament est due aux différentes cinétiques d'assemblage aux extrémités microtubulaires, l'extrémité polymérisant le plus vite (extrémité positive ou "plus end") étant couronnée par des sous-unités β et l'extrémité plus lente (extrémité négative ou "minus end") par des sous unités α (Bergen and Borisy, 1980). Le nombre de protofilaments généralement observé dans des microtubules *in vivo* est treize mais peut varier entre dix et seize.

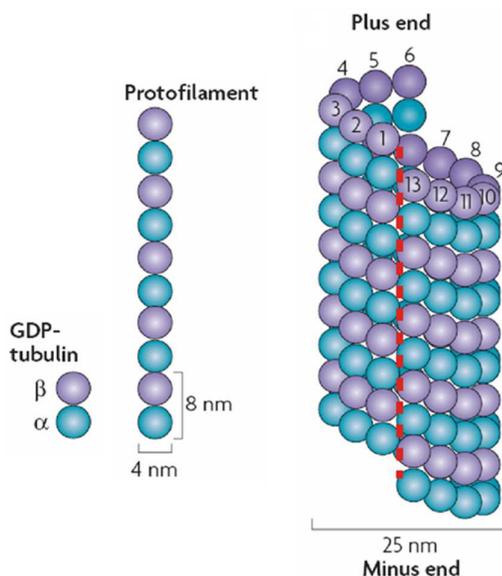


Figure 6 : Représentations schématiques de protofilaments et de microtubules.

Gauche : Représentation schématique d'un protofilament de 4 nm de largeur, formé par assemblage longitudinal à la queue-leu-leu de dimères de tubuline $\alpha\beta$ (d'après (Akhmanova and Steinmetz, 2008)). **Droite :** Représentation schématique d'un microtubule de 25 nm de diamètre, formé par assemblage latéral de 13 protofilaments, en conformation B (d'après Akhmanova et Steinmetz, 2008).

- **Dynamique des microtubules**

In vitro et *in vivo*, les microtubules adoptent par défaut une structure labile et oscillent en permanence entre une phase de croissance et d'instabilité, processus connu sous le nom d'instabilité dynamique (Mitchison and Kirschner, 1984; Desai and Mitchison, 1997). Elle dépend de quatre paramètres : le taux de polymérisation et de dépolymérisation, la fréquence des « catastrophes » (transition entre polymérisation et dépolymérisation) et de « sauvetage » (transition entre dépolymérisation et polymérisation) (Janosi et al., 2002).

In vitro, l'assemblage des microtubules à partir de dimères de tubuline libre est un processus thermo-dépendant, nécessitant un apport d'énergie : la polymérisation de tubuline s'effectue en effet entre 30 et 37°C en présence d'une concentration critique de GTP et de magnésium (Weisenberg, 1972). Le renouvellement des sous unités du microtubule s'effectue selon deux mécanismes non exclusifs : le phénomène de tapis roulant

(assemblage net à l'extrémité positive et désassemblage net à l'extrémité négative : les sous-unités diffusent de l'extrémité positive à l'extrémité négative) et le phénomène d'instabilité dynamique (fluctuations spontanées de la longueur des microtubules à l'équilibre : phase de croissance à l'extrémité positive, stabilité de la longueur du microtubule, phase de diminution due à la dépolymérisation) (Margolis et al., 1978; Mitchison and Kirschner, 1984).

- ***Modifications post-traductionnelles des microtubules***

La tubuline peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles, générant une grande diversité dans les populations de microtubules (Westermann and Weber, 2003). Toutes ces modifications post-traductionnelles représentent un véritable « code tubuline », comparable au code histone qui régule l'assemblage de la chromatine et la transcription des gènes (Verhey and Gaertig, 2007). Ce code module la fonction de la tubuline mais influence également le recrutement des effecteurs microtubulaires comme les MAPs et régule alors les fonctions liées aux MTs (Hammond et al., 2008). Toutes ces modifications ont lieu au niveau des sous-unités de tubuline déjà incorporées dans les MTs sauf pour la phosphorylation de la serine 172 de la tubuline β qui a lieu sur la tubuline non-polymérisée (Fourest-Lieuvain et al., 2006). Ces différentes modifications post-traductionnelles peuvent avoir lieu sur des sites très proches, ce qui laisse penser qu'une modification peut influencer l'apparition d'autres modifications.

L'acétylation de la tubuline

La tubuline α peut être acétylée au niveau de la lysine 40, orientée vers la lumière du MT (Nogales, 1999). L'ajout d'un groupement acétyl est réalisé par une acétyltransférase et son retrait par une déacétylase (Hubbert et al., 2002; North et al., 2003). L'acétylation est souvent associée à un état stable et à une plus grande résistance vis-à-vis des drogues dépolymérisantes des MTs (Reed et al., 2006).

La polyglutamylation de la tubuline

La polyglutamylation consiste à ajouter une chaîne de résidus glutamate sur des résidus glutamate, situés au niveau carboxy-terminal des tubulines α et β (Edde et al., 1990; Alexander et al., 1991). Cette modification est prépondérante dans les neurones de mammifères et présente essentiellement au niveau des MTs stables des axones. Au cours du développement neuronal, la polyglutamylation augmente et contrôle l'interaction des différentes MAPs avec les MTs : les protéines Tau, MAP1B, et MAP2 ont une faible affinité pour les MTs polyglutamylés alors que la protéine MAP1A se lie préférentiellement à la tubuline polyglutamylée (Audebert et al., 1994; Bonnet et al., 2001).

Le cycle détyrosination/tyrosination de la tubuline

La tubuline α est synthétisée avec une tyrosine comme acide aminé carboxy-terminal, on la nomme « tubuline Tyr ». Cette tyrosine peut être clivée par une Tubuline CarboxyPeptidase (TCP) encore non-identifiée. La tubuline α expose ainsi un résidu glutamate, elle est alors nommée « tubuline Glu ». Une tyrosine peut être remise en place grâce à la Tubuline Tyrosine Ligase (TTL) (Barra et al., 1988; MacRae, 1997). La « tubuline Glu » peut subir un autre clivage enzymatique et perdre son résidu glutamate carboxy-terminal, la tubuline qui en résulte est appelé tubuline $\Delta 2$ (Paturle-Lafanechere et al., 1991). La détyrosination traduit la durée de vie d'un MT. En effet, plus un MT est détyrosiné, plus le début de sa polymérisation est ancienne (Khawaja et al., 1988). D'un point de vue quantitatif, les MTs neuronaux contiennent environ 20% de tubuline tyrosinée, 40% de tubuline détyrosinée et 40% de tubuline- $\Delta 2$ (Paturle-Lafanechere et al., 1994). Cette tubuline $\Delta 2$ est une isoforme de tubuline spécifiquement présente dans les neurones différenciés, aussi bien dans les dendrites que dans les axones (Paturle-Lafanechere et al., 1994; Guillaud et al., 1998). L'invalidation du gène codant pour la TTL a permis de mettre en évidence que le cycle détyrosination/tyrosination de la tubuline α est impliqué dans la différenciation neuronale, le positionnement du noyau et la morphogénèse (Erck et al., 2005; Peris et al., 2006).

La phosphorylation de la tubuline

Lors de la purification de tubuline de cerveau, de la tubuline β phosphorylée a été identifiée (Eipper, 1972). La phosphorylation de la tubuline, notamment de la tubuline β III, intervient dans la différenciation et la croissance neuritique des cellules de neuroblastomes de souris en culture (Gard and Kirschner, 1985). Cette phosphorylation dépend de la quantité de tubuline assemblée en MTs car le taxol (qui stabilise les MTs) augmente la quantité de tubuline phosphorylée alors que le nocodazole (qui entraîne une dépolymérisation des MTs) diminue cette quantité.

La palmitoylation de la tubuline

La palmitoylation de la tubuline (c'est-à-dire l'ajout d'un acide palmitique) permettrait la localisation de la tubuline à la membrane (Wolff et al., 2000).

• **Rôle des microtubules dans la croissance neuronale**

Les neurones nécessitent une organisation dynamique et coordonnée des réseaux de microtubules et d'actine pour acquérir leur morphologie spécifique et polarisée durant le neurodéveloppement. La dynamique des microtubules neuronaux est fortement régulée par leur interaction avec de puissants effecteurs modifiant leur stabilité (Heald and Nogales,

2002). La stabilité des microtubules est favorisée grâce aux MAPs (*Microtubule Associated Proteins*) et l'instabilité est provoquée par des facteurs dépolymérisant comme les stathmines ou les Kin1 (Desai et al., 1999; Cassimeris, 2002). Au sein du laboratoire, la présence d'une importante sous population de microtubules stables (résistants aux drogues dépolymérisantes ou à l'exposition au froid) a été mise en évidence dans les neurones (Pirrollet et al., 1983; Job and Margolis, 1984; Margolis and Job, 1984).

Neuritogenèse

Des changements spécifiques dans le cytosquelette de microtubule et d'actine sont à la base de l'induction de la formation neuritique. L'observation des réarrangements du cytosquelette durant l'initiation neuritique suggère l'importance du rôle des microtubules dans ce processus (Yu et al., 2001; Dehmelt et al., 2003).

Les microtubules auraient deux fonctions principales et distinctes durant la neuritogenèse : l'invasion de nombreux microtubules individuels dans le lamellipode entraîne l'initiation neuritique tandis que leur assemblage aux extrémités, leur stabilisation et leur regroupement en faisceaux permet l'élongation et la maturation des extensions neuritiques naissantes (Smith et al., 2004).

L'élongation axonale

Des études pionnières ont démontré que l'addition de nouveaux polymères de microtubules était nécessaire à la croissance rapide de l'axone (Daniels, 1975). L'addition de microtubules pourrait résulter soit du transport de microtubules préassemblés du corps cellulaire à l'axone en croissance (Lasek, 1986), soit d'un assemblage de nouveaux polymères en cours de synthèse en région distale de l'axone en croissance (Bamburg et al., 1986). Les deux mécanismes semblent contribuer à l'élaboration de microtubules nécessaires à la croissance axonale.

La dynamique des microtubules dans le cône de croissance

Les études de neurones en culture ont révélé que les microtubules ont une organisation particulière à l'intérieur du cône de croissance. Les microtubules forment, dans le corps axonal, un réseau dense et parallèle mais ont tendance à se défasciculer lorsqu'ils entrent dans le domaine central du cône de croissance (Gordon-Weeks, 1991b, a; Tanaka and Kirschner, 1991). Ils adoptent une morphologie relativement droite dans les cônes de croissance en extension ou forment des boucles proéminentes quand les cônes de croissance sont dans une phase de repos (Tanaka and Kirschner, 1991; Abrous et al., 2005). Tandis que les microtubules acétylés, stables et fasciculés, colonisent le cou et le domaine central du cône de croissance, une sous-population de microtubules dynamiques,

qui ont conservé leur tyrosine C-terminale, peuvent rapidement s'étendre et se rétracter des régions riches en actine F dans le domaine périphérique des cônes de croissance. Ces microtubules s'alignent sur l'axe longitudinal des filopodes et entrent transitoirement dans leur part proximale (Gordon-Weeks, 1991b, a; Schaefer et al., 2002) (figure 7). De plus, les microtubules interagissent avec les structures intrapodiales de l'actine à l'intérieur du lamellipode et permettent une régulation réciproque des réseaux cytosquelettiques (Rochlin et al., 1999).

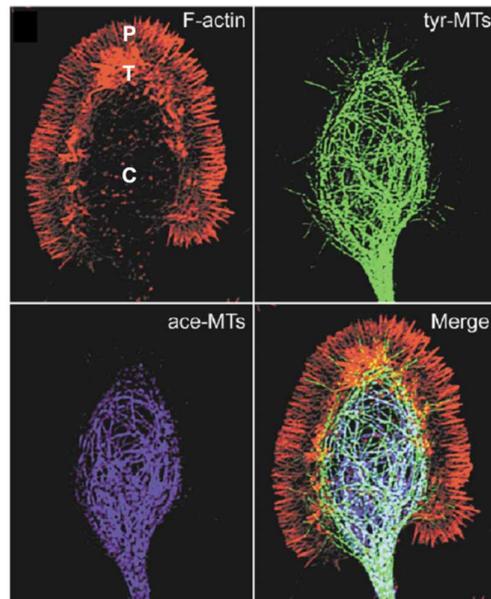


Figure 7 : Distribution du cytosquelette microtubulaire dans le cône de croissance (Extrait de Dent et Gertler, 2003).

Les microtubules dynamiques (tyrosinés, Tyr-MTs) sont notamment présents à la périphérie du cône de croissance dans les régions riches en F-actine. Les microtubules stables (acétylés, ace-MTs) sont limités au domaine central du cône de croissance et ne colocalisent pas avec la F-actine.

Rôle des microtubules et des filaments d'actine dans le transport neuronal

Les mouvements impliquant les microtubules et l'actine sont générés par une classe de complexes enzymatiques ; les « moteurs moléculaires ». Ces protéines hydrolysent l'ATP pour générer l'énergie nécessaire à la translocation de molécules le long des polymères. Les moteurs moléculaires associés aux microtubules sont la dynéine (transport rétrograde) et les kinésines (transport antérograde). Les seuls moteurs moléculaires associés à l'actine identifiés appartiennent à la famille des myosines. Chacune de ces molécules est formée d'un domaine globulaire « moteur » qui hydrolyse l'ATP et interagit avec les microtubules ou l'actine F, et à l'autre extrémité d'un domaine appelé « cargo » qui interagit avec les

organites cytoplasmiques qu'il convoie le long des polymères (Karcher et al., 2002; Welte, 2004; Marx et al., 2005).

Polarité des microtubules dans les axones et dans les dendrites

Il existe une différence concernant la polarité des microtubules dans les axones et les dendrites. Dans les axones, les microtubules sont tous orientés avec leur extrémité (+) vers le cône de croissance, alors que dans les dendrites, ils sont orientés dans les deux sens (Baas et al., 1991). Cette hétérogénéité de polarité des microtubules dans les axones et les dendrites est un des éléments permettant d'établir les différences fondamentales qui existent entre ces deux types de prolongements, tant d'un point de vue morphologique que fonctionnel.

2.2.1.4 Les protéines associées aux microtubules neuronaux (MAP neuronales)

La réorganisation dynamique du réseau microtubulaire supporte et régule les changements de forme permettant aux neurones d'acquérir leur morphologie fonctionnelle spécifique durant le développement. Les protéines régulant les microtubules dans les cellules agissent directement sur les microtubules en les stabilisant ou en promouvant leur assemblage, dépolymérisation ou fragmentation, alors que d'autres contrôlent la quantité de tubuline libre pour moduler leur dynamique. Ces protéines stabilisant les microtubules sont dites structurales. D'autres exercent un rôle de moteur moléculaire.

La stabilisation microtubulaire est un processus essentiel durant la morphogénèse neuronale. De nombreuses protéines stabilisent les microtubules dans les cellules et constituent différentes familles avec des propriétés moléculaires, biochimiques et fonctionnelles spécifiques. La différence de composition en MAP dans les axones et les dendrites a probablement une incidence sur la morphologie neuronale (Matus, 1990a, b).

Parmi les MAP structurales, on peut citer :

MAP1 :

Chez la plupart des vertébrés, les protéines MAP1 sont au nombre de 3 : MAP1A, MAP1B et la plus légère MAP1S (Halpain and Dehmelt, 2006). Les protéines MAP1A et MAP1B sont capables de promouvoir l'assemblage de la tubuline, de lier et de stabiliser les MTs lors de leur exposition aux drogues dépolymérisantes (comme le nocodazole) (Hirokawa, 1994; Bondallaz et al., 2006). Elles peuvent également interagir avec les microfilaments d'actine (Togel et al., 1998; Noiges et al., 2002) et faire alors le lien entre ces

deux éléments du cytosquelette. La protéine MAP1S diffère des autres MAP1 : seule sa chaîne légère possède un domaine de liaison aux MTs à son extrémité amino-terminale. Elle est également capable de lier les filaments d'actine via son domaine de liaison situé sur la chaîne légère.

L'expression des MAP1 est fortement régulée au cours du développement : la protéine MAP1B est exprimée majoritairement au stade précoce du développement neuronal puis son taux d'expression diminue chez l'adulte. Le profil d'expression de MAP1A est l'inverse de celui de la protéine MAP1B (Schoenfeld et al., 1989; Tucker et al., 1989). MAP1S, quant à elle, est une protéine ubiquitaire et son profil d'expression se rapproche de celui de la protéine MAP1A (Orban-Nemeth et al., 2005).

La protéine MAP1A est fortement exprimée au niveau des dendrites et joue un rôle dans le contrôle de la synaptogénèse ; l'augmentation croissante de sa concentration est concomitante avec l'expansion de l'arborisation dendritique (Szebenyi et al., 2005). La protéine MAP1B est présente dans tous les compartiments neuronaux, elle est retrouvée de manière prépondérante au niveau des axones en développement et de leurs cônes de croissance (Black et al., 1994). Les neurones de souris invalidées pour le gène codant pour MAP1B migrent de manière anormale et présentent des défauts de croissance (Edelman et al., 1996). La protéine MAP1B peut être phosphorylée : on observe alors une diminution de la stabilité des MTs (Goold et al., 1999). MAP1B joue donc un rôle essentiel dans la croissance axonale en influençant l'équilibre stabilité / dynamique des microtubules au niveau des cônes de croissance.

MAP2 :

Chez les mammifères, la famille MAP2 est composée de différentes isoformes (de haut poids moléculaire et de plus bas poids moléculaire) hautement exprimées dans le système nerveux central (Neve et al., 1986). Les protéines MAP2 peuvent lier les MTs et réguler leur dynamique en les stabilisant (Kaech et al., 2001). Cette liaison aux MTs dépend de l'état de phosphorylation des protéines MAP2 : les MAP2 non phosphorylées ou hyper-phosphorylées ne s'associent plus aux MTs (Brugg and Matus, 1991). Le domaine de liaison aux MTs est également impliqué dans l'interaction des MAP2 avec les microfilaments d'actine. Cependant, le rôle de MAP2 dans la liaison du cytosquelette d'actine aux MTs reste à établir (Roger et al., 2004). Les protéines MAP2A et MAP2B sont exclusivement exprimées dans le soma et les dendrites des neurones (Caceres et al., 1984a; Caceres et al., 1984b). MAP2B est exprimée tout au long du développement du système nerveux et persiste à l'âge adulte alors que MAP2A est majoritairement exprimée dans le cerveau adulte (Tucker et al., 1988).

MAP2C est l'isoforme juvénile des MAP2 : son expression diminue très tôt au cours du développement neuronal (Doll et al., 1993).

L'inhibition de l'expression de MAP2 dans des neurones primaires différenciés, grâce à des oligonucléotides anti-sens, entraîne une diminution du nombre de neurites ainsi qu'une désorganisation du réseau microtubulaire neuritique (Sharma et al., 1994). Les protéines MAP2 semblent donc être impliquées dans la morphogénèse neuronale. Cependant, les souris invalidées pour le gène codant pour les protéines MAP2 ne présentent aucune anomalie dans l'organisation du système nerveux central (Teng et al., 2001), ni dans la polarisation des neurones. Un raccourcissement des dendrites de ces neurones est cependant remarqué après plusieurs semaines de culture.

L'absence des protéines MAP2 dans des neurones en culture et dans l'animal entier n'aboutit pas au même phénotype, probablement à cause d'une compensation par d'autres MAPs. En effet, des souris doublement déficientes pour les gènes *map2a* et *map1b* présentent des défauts de la croissance neuronale, plus sévères que ceux observés chez les souris simplement invalidées pour le gène *map1b* (Teng et al., 2001).

- Les protéines STOP (Stable Tubule Only Polypeptide) ou MAP6 qui seront décrites plus en détail dans le chapitre suivant.

- Tau :

Chez les mammifères, la protéine Tau est codée par un seul gène. Ses six isoformes sont exprimées de façon différentielle dans les neurones durant le développement et sont capables, *in vitro* et *in vivo*, de stabiliser les microtubules contre le désassemblage induit par les drogues dépolymérisantes (Drubin and Kirschner, 1986a; Drubin and Kirschner, 1986b). Toutes les isoformes de Tau sont capables de lier les MTs, de les stabiliser et de les protéger contre les « catastrophes » en favorisant l'assemblage de tubuline à leur extrémité positive (Trinczek et al., 1995). La liaison aux MTs des protéines Tau est fortement régulée par leur état de phosphorylation qui inhibe leur association avec les MTs (Cho and Johnson, 2003).

Dans des cas pathologiques, comme par exemple dans la maladie d'Alzheimer, la protéine Tau est hyper-phosphorylée et forme des agrégats dans le neurone entraînant une « dystrophie » des neurites (Grundke-Iqbal et al., 1986b; Grundke-Iqbal et al., 1986a; Stoothoff and Johnson, 2005). Les protéines Tau sont essentiellement localisées dans les axones. Elles semblent jouer un rôle majeur dans la maturation neuronale (Binder et al., 1985). L'inhibition de l'expression des protéines Tau par des oligonucléotides anti-sens entraîne un ralentissement de la croissance axonale dans des cultures primaires de

neurones (Caceres and Kosik, 1990). Cependant, l'invalidation du gène tau chez la souris, n'entraîne pas de pousse ralentie des axones, excepté au niveau des axones de petits calibres où la proportion de Tau est normalement supérieure par rapport aux autres MAPs (Harada et al., 1994). Des phénomènes compensatoires peuvent expliquer cette absence de défauts. En effet, ces souris présentent une augmentation de l'expression de MAP1A (Dawson et al., 2001). De plus, les souris doublement déficientes pour les protéines Tau et MAP1B ont des défauts plus sévères que les souris simplement déficientes soit pour Tau soit pour MAP1B. Ces résultats mettent clairement en évidence que ces deux protéines ont des fonctions redondantes dans l'organisation des MTs au niveau de la différenciation neuronale (Takei et al., 2000). Enfin, la protéine Tau se lie aux MTs et organise la polarité neuronale (Greenberg et al., 1994). Sur des cultures primaires de neurones, les neurites se développant au cours des premières heures qui suivent la mise en culture sont indifférenciés et contiennent à la fois la protéine tau et la protéine MAP2. Lorsque les neurones commencent à se polariser, la protéine tau devient prépondérante dans le prolongement qui deviendra l'axone (Kosik et al., 1989).

Doublecortine :

La Doublecortine (DCX) est une MAP de 40 kDa exprimée dans les neurones en migration dans le système nerveux central et périphérique pendant le développement embryonnaire postnatal. Elle stimule la formation de faisceaux parallèles de MTs, *in vitro* et *in vivo* (Francis et al., 1999) et stabilise également les MTs en inhibant leur dépolymérisation et en favorisant leur nucléation (Moores et al., 2004; Moores et al., 2006). Comme chez les autres MAPs, la phosphorylation de DCX modifie ses propriétés : inhibition de la liaison aux MTs et de l'effet sur leur polymérisation (Schaar et al., 2004; Tanaka et al., 2004a; Tanaka et al., 2004b). La protéine DCX est exprimée pendant le développement embryonnaire et se localise dans la partie distale des neurites en croissance des neurones immatures en cours de migration (Gleeson et al., 1999; Schaar et al., 2004). Ce patron d'expression montre que la protéine DCX joue un rôle central dans la différenciation et la migration neuronale. En effet, les cellules déficientes en DCX ont plus de branchements dendritiques, des défauts de translocation nucléaire et des taux plus faibles de migration (Kappeler et al., 2006; Koizumi et al., 2006b; Koizumi et al., 2006a; Kappeler et al., 2007).

Chez l'homme et la souris les mutations de la DCX sont responsables du Syndrome de la Lissencéphalie de type I lié au chromosome X (maladie caractérisée par un retard mental et des crises d'épilepsie sévères). Les principales caractéristiques sont des défauts sévères dans la migration des neurones corticaux (des Portes et al., 2004). La plupart des mutations mises en évidence dans cette pathologie se situent au niveau du domaine de liaison aux

MTs de la protéine DCX (Taylor et al., 2000). De façon surprenante, des souris exprimant des formes mutées de DCX n'ont pas de malformations corticales mais possèdent des anomalies de lamination de l'hippocampe (Corbo et al., 2002, Kappeler et al., 2006). La distance de migration des neurones est beaucoup plus importante chez l'Homme que chez la souris, ce qui pourrait expliquer la plus grande sensibilité chez l'Homme de l'absence de DCX (Kerjan and Gleeson, 2007). DCX apparaît ainsi comme un facteur essentiel à la maintenance de la morphologie bipolaire des neurones, elle-même nécessaire à leur propre migration durant le développement. La capacité de contrôler la morphologie neuronale durant la migration suggère aussi un rôle dans la morphogénèse neuronale à des stades plus tardifs de différenciation.

- ***Compensations et/ou régulations des protéines stabilisatrices entre elles***

Les protéines MAP1B, MAP2 et Tau sont des protéines essentielles dans la stabilisation des MTs, nécessaires au développement neuronal. Chacune de ces protéines a une fonction spécifique à chaque étape du développement neuronal. Elles ne sont pas toutes associées au même moment et en permanence aux MTs neuronaux. Mais elles peuvent avoir des rôles redondants ou coopératifs ainsi qu'en association avec les protéines DCX et STOP. Alors que l'inhibition de Tau dans les neurones empêche l'élongation neuritique, les souris déficientes en protéine Tau ne présentent aucun défaut. En revanche, une augmentation de la protéine MAP1A est observée chez ces souris (Harada et al., 1994; Dawson et al., 2001) et pourrait expliquer le phénotype observé. Les souris doublement déficientes en MAPs classiques ont des défauts plus sévères que les souris simplement déficientes, expliquant que l'activité des différentes MAPs semble pouvoir se compenser (DiTella et al., 1996; Takei et al., 2000; Teng et al., 2001).

La protéine DCX coopère avec MAP2 pour stabiliser les MTs pendant la formation des neurites, en ayant des activités différentes. La protéine MAP2 semble augmenter la stabilité des MTs pour permettre la formation des neurites alors que DCX semble induire la formation de faisceaux de MTs, contrôlant la segmentation du lamellipode pour permettre la formation des filopodes. L'inhibition de MAP2 empêche la naissance des neurites alors que la déplétion de DCX dans les neurones corticaux augmente le nombre de neurites (Bielas and Gleeson, 2004; Bielas et al., 2007). La coopération de ces différentes MAP est clairement nécessaire au cours du développement neuronal.

2.2.2 Les protéines STOP

2.2.2.1 Historique

Les microtubules stables possèdent la propriété de résister aux conditions dépolymérisantes comme le traitement aux drogues dépolymérisantes (nocodazole...) ou l'exposition aux basses températures (<15°C). Les cellules de mammifères renferment une quantité abondante de microtubules stables particulièrement au niveau des extensions neuritiques des cellules neuronales (Baas et al., 1991; Baas and Joshi, 1992). L'origine et la signification d'une telle stabilité des microtubules sont cependant incertaines. Il semblerait que les microtubules stabilisés soient nécessaires à la génération et au maintien de la morphologie neuronale mais aussi à l'établissement de connexions interneuronales sur de longues distances (Guillaud et al., 1998).

Les MAPs classiques (MAP1, MAP2, Tau) sont les principaux facteurs responsables de la stabilité des microtubules, capables de les protéger de la dépolymérisation induite indirectement par le nocodazole. Néanmoins, ils sont incapables de conférer une stabilité à l'exposition au froid, même quand ils sont additionnés à de fortes concentrations dans des cellules vivantes (Pirollet et al., 1983; Baas et al., 1994). La stabilité au froid ne proviendrait pas d'une dénaturation des microtubules et les facteurs responsables de cette stabilisation seraient distincts de la tubuline. La recherche de ces facteurs a permis d'identifier les protéines STOP (*Stable Tubule Only Polypeptide*) chez les vertébrés. Elles ont été initialement isolées à partir de préparations de microtubules stables au froid de cerveau de rat et caractérisées comme responsables de leur résistance à la dépolymérisation induite par le froid (Job et al., 1982). La production d'anticorps monoclonaux spécifiques a permis de purifier celle-ci en plus grande quantité sur colonne d'immunoaffinité (Margolis et al., 1986; Pirollet et al., 1989). Parallèlement, il a été montré que l'activité stabilisatrice des protéines STOP était inhibée par le complexe Ca²⁺/calmoduline et par la phosphorylation à l'aide de deux types de protéines kinases, l'une étant dépendante du complexe Ca²⁺/calmoduline et l'autre non (Job et al., 1981; Job and Margolis, 1984; Margolis and Job, 1984; Pirollet et al., 1992).

Par la suite, des expériences *in vitro* ont permis de montrer que la protéine STOP purifiée était capable de stabiliser les microtubules vis-à-vis du désassemblage induit par leur dilution. Des expériences d'immunofluorescence ont révélé qu'elle était spécifiquement associée aux microtubules du fuseau mitotique des neurones des ganglions de la racine dorsale (DRG pour « *Dorsal root ganglion* »), particulièrement à la sous-population microtubulaire résistantes aux basses températures (Margolis et al., 1990).

2.2.2.2 Les différentes isoformes des protéines STOP

Les protéines STOP sont codées par un seul gène qui a été localisé chez la souris (gène *mtap6*) au niveau de la région E2-F1 du chromosome 7 (Denarier et al., 1998b). Ce gène est composé de quatre exons (Denarier et al., 1998b). L'exon 1 code pour la région N-terminale et la région répétée centrale (figure 9). Cette région est composée de cinq répétitions d'une séquence de 46 acides aminés chez le rat (Bosc et al., 1996). Quatre répétitions sont homologues à 98% par rapport à la séquence consensus la cinquième présentant une légère divergence (72% d'homologie). Le nombre de séquences répétées peut varier d'une espèce à l'autre et dans une espèce donnée. L'exon 2 et l'exon 3 codent respectivement pour un domaine « Linker », région de liaison sans particularité, et un domaine basique, riche en résidus lysine et arginine (KR). L'exon 4 code pour la région répétée C-terminale constituée de 28 répétitions imparfaites d'une séquence de 11 acides aminés. Ce nombre varie aussi selon les espèces (31 pour l'homme).

Actuellement, cinq isoformes de la protéine STOP ont été mise en évidence N-STOP, E- STOP, F-STOP, O-STOP et A-STOP (figure 8) (Bosc et al., 1996; Denarier et al., 1998a; Guillaud et al., 1998; Galiano et al., 2004). Les différents variants tissulaires et développementaux des protéines STOP sont générés par épissage alternatif ou utilisation de promoteurs distincts (Aguazzoul et al., 2003).

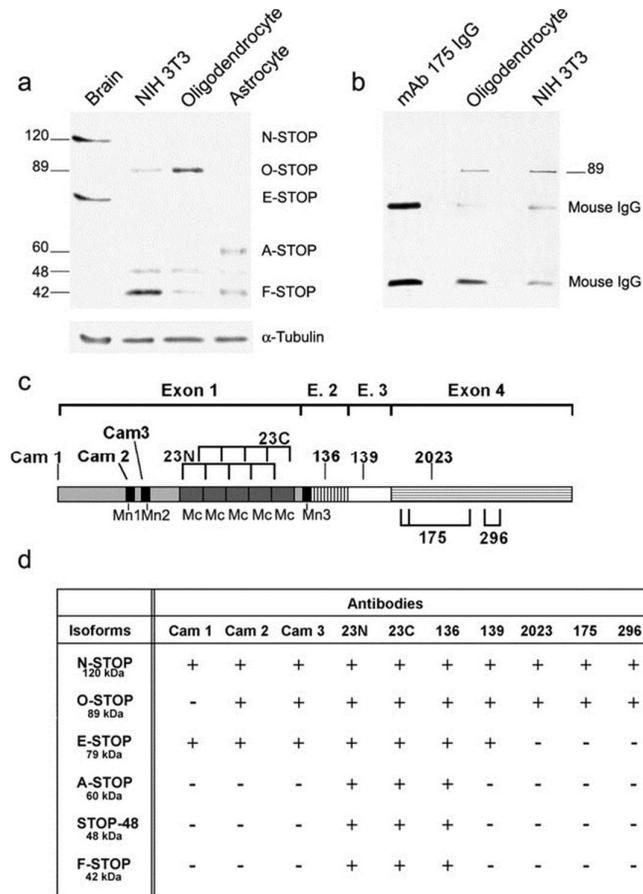


Figure 8 : Présentation des différents antigènes de STOP contenus dans des cultures d'oligodendrocytes et d'astrocytes (d'après Galiano et al, 2004).

a : immunoblots d'extraits protéiques de cerveaux de souris (*brain*), de cellules NIH 3T3 (*NIH 3T3*), d'oligodendrocytes (*oligodendrocyte*), et d'astrocytes (*astrocyte*) révélés avec l'anticorps 23C. **b :** immunoblots de protéines immunoprécipitées à partir d'extraits cellulaires d'oligodendrocytes et de NIH 3T3 et révélés par l'anticorps 175. L'anticorps 175 purifié et utilisé pour immunoprécipiter les différentes isoformes de STOP fait office de contrôle interne. **c :** représentation schématique des différents domaines structuraux de la protéine N-STOP. Les épitopes reconnus par les anticorps 23N, 23C, 136, 139, CaM1, CaM2, CaM3, 136, 139, 2023, 296 et 175 sont représentés sur le schéma. **d :** tableau représentatif des différents fragments protéiques des isoformes de STOP (N-STOP (120 kDa), O-STOP (89 kDa), E-STOP (79 kDa), A-STOP (66 kDa) et F-STOP (42 kDa)) reconnus par les anticorps spécifiques des protéines STOP. + : immunoréactivité de l'anticorps avec le fragment protéique, - : absence d'immunoréactivité de l'anticorps avec le fragment protéique.

2.2.2.3 Les isoformes neuronales N-STOP et E-STOP

- **Structure moléculaire des isoformes neuronales**

Deux isoformes neurospécifiques ont été initialement caractérisées chez le rat : une isoforme neuronale précoce E-STOP (Early-STOP) et une isoforme neuronale adulte N-STOP (Neuronal-STOP) (Bosc et al., 1996; Guillaud et al., 1998) (figure 9). L'isoforme N-STOP ne présente aucune homologie avec les MAPs décrites jusqu'à présent. C'est une protéine basique sur toute sa longueur (pHi = 9,52) et de 145 kDa chez la souris (952 acides aminés). Elle renferme cinq répétitions centrales (quatre chez la souris) et une région C-

terminale complète. L'isoforme E-STOP de souris a un poids moléculaire apparent de 79 kDa apparent. Elle résulte de la transcription des 3 premiers exons à partir du même promoteur que N-STOP et est donc dépourvue de la région C-terminale.

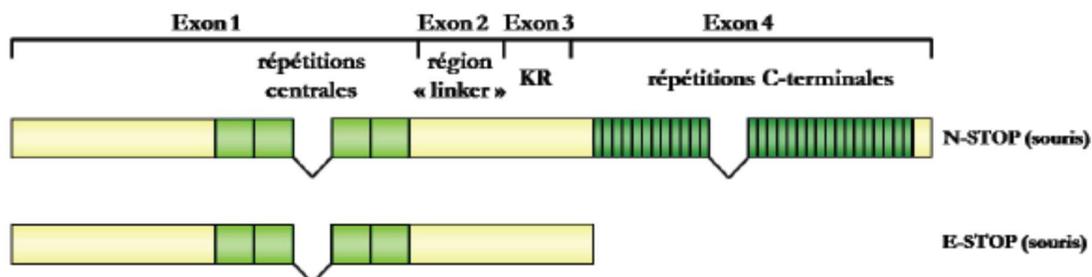


Figure 9 : Représentation schématique des isoformes neuronales N- et E-STOP de souris.

Le gène codant pour les protéines N- et E-STOP est composé de 4 exons (Exon 1 à 4). La protéine E-STOP est dépourvue des répétitions carboxy-terminales.

- **Expression et localisation tissulaires, cellulaires et subcellulaires des isoformes neuronales**

L'expression des isoformes N-STOP et E-STOP est spécifique des neurones mais de manière différentielle au cours du développement (Guillaud et al., 1998). N-STOP est exprimée majoritairement et uniquement dans le cerveau adulte alors que l'expression d'E-STOP est majoritaire dans le cerveau embryonnaire puis persiste en moindre quantité dans le cerveau adulte. Les protéines STOP neuronales sont exprimées dans toutes les régions du cerveau mais sont particulièrement enrichies dans les glomérules du bulbe olfactif, la couche VII du cortex, l'hippocampe, l'hypothalamus et le cervelet (Andrieux et al., 2002; Couegnans et al., 2007). Dans les neurones des DRGs et les neurones sympathiques de rat en culture, les protéines N- STOP et E-STOP sont majoritairement associées aux microtubules axonaux stables, détyrosinés et acétylés (Bosc et al., 2001). L'analyse de la distribution des isoformes neuronales en microscopie électronique confirme qu'elles sont associées et réparties de façon homogène sur toute la longueur des microtubules axonaux. En revanche, dans les neurones sympathiques, l'immunoréactivité STOP décroît au fur et à mesure que l'on s'approche de l'extrémité distale de l'axone et du cône de croissance (Guillaud et al., 1998; Slaughter and Black, 2003). Ces résultats suggèrent que la répartition intra-axonale des protéines STOP peut varier suivant la population neuronale considérée. Au niveau de la région CA1 de l'hippocampe, les protéines STOP sont détectables dans les axones et sous forme de marquage dispersé dans les épines dendritiques (Andrieux et al., 2002). L'analyse de synaptosomes montre que les protéines STOP sont préférentiellement

associées aux structures pré- ou postsynaptiques insolubles telles que les radeaux lipidiques ou la cytomatrice.

- ***Fonction des isoformes neuronales***

La transfection de l'ADNc des isoformes N-STOP dans des cellules HeLa, dépourvues de STOPs endogènes et de microtubules stables, entraîne l'association de N-STOP aux microtubules à 37°C, l'apparition de résistance des microtubules au froid et au nocodazole. (Bosc et al., 1996) (figure 10). Les protéines STOP neuronales sont donc impliquées dans la régulation de la dynamique des microtubules et leur stabilité.

Dans les cellules PC12 différenciées, l'inhibition des protéines STOP par des anticorps dirigés contre l'extrémité N-terminale (23N) ou C-terminale (23C) de leurs répétitions centrales ou par des oligonucléotides antisens microinjectés abolit la stabilité au froid et la résistance au nocodazole des microtubules dans les neurites, sans entraîner de modifications de leur structure en conditions physiologiques de culture (37°C), ni altérer la morphologie neuritique (Guillaud et al., 1998). Les neurites peuvent donc survivre en absence de microtubules complètement stables, du moins durant le temps de l'expérience. Par contre, l'inhibition de STOP dans des cellules qui ne sont pas encore différenciées affecte directement les mécanismes de la formation neuritique. Les protéines STOP seraient ainsi nécessaires à l'induction de la neuritogenèse ou exerceraient un rôle indirect dans la différenciation neuronale. Une fonction similaire a été décrite pour MAP1B, MAP2 et Tau (Caceres et al., 1991; Caceres et al., 1992; Brugg et al., 1993; Sharma et al., 1994).

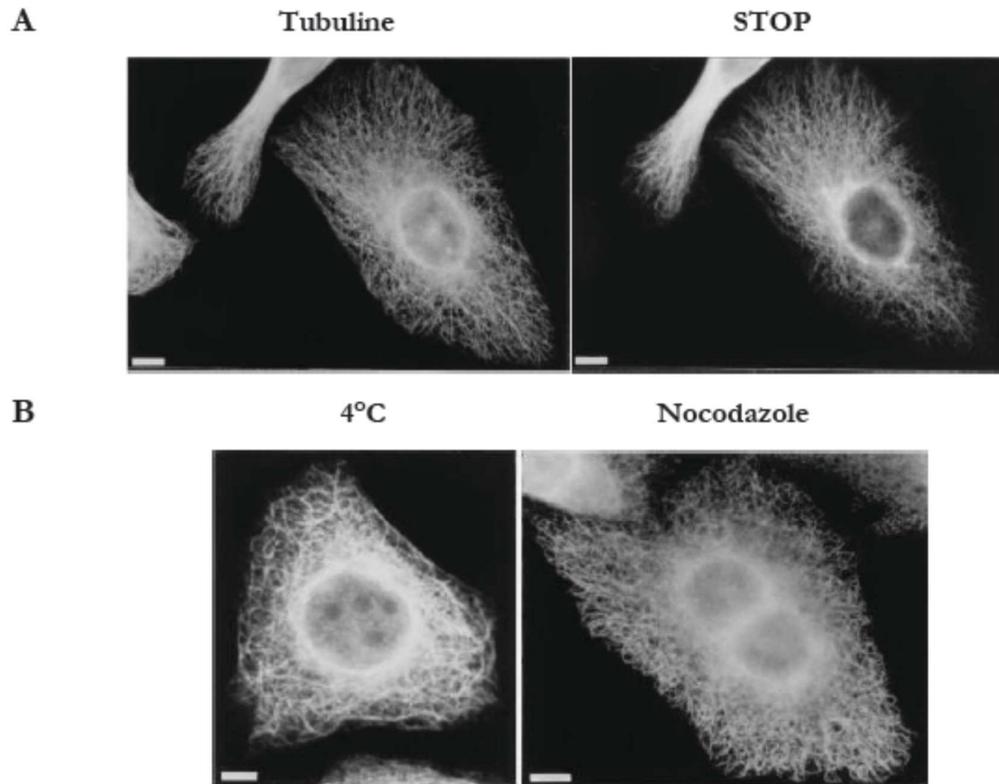


Figure 10 : Stabilisation des microtubules des cellules HeLa après transfection de l'ADNc de N-STOP.

Les cellules HeLa sont transfectées avec l'ADNc codant pour la protéine N-STOP. Après 48 h, les cellules sont soit immédiatement fixées (**A**) soit exposées au froid (4°C) soit au Nocodazole 10µM (**B**). **A** : Les cellules HeLa sont doublement marquées à l'aide d'un anticorps anti-tubuline (Tubuline) et d'un mélange d'anticorps dirigés contre la protéine N-STOP. **B** : Marquage de la tubuline après exposition au froid (4°C) ou au Nocodazole des cellules HeLa transfectées. D'après Bosc *et al*, 1996.

La protéine STOP peut être phosphorylée par la kinase CaMKII (*Ca²⁺/calmoduline~dependent kinase II*), enzyme clef de la plasticité synaptique (Bosc *et al.*, 1996; Baratier *et al.*, 2006). La forme phosphorylée de STOP (*STOP-P*) présente des propriétés différentes de celles des formes non phosphorylées. En effet, STOP-P ne se lie plus aux microtubules *in vitro* (Baratier *et al.*, 2006). De plus, dans des neurones primaires d'hippocampe âgés de 12 jours en culture, STOP phosphorylée est localisée de façon diffuse dans des régions dépourvues de microtubules, notamment au niveau de points de branchement axonaux et de boutons dendritiques (figure 11). D'autre part, l'activation des neurones par une exposition au glutamate de 15 min aboutit à une augmentation du marquage de la STOP-P dans les épines dendritiques, et l'exposition à l'inhibiteur KN62 des kinases dépendantes de la calmoduline conduit, au contraire, à sa suppression (Baratier *et al.*, 2006).

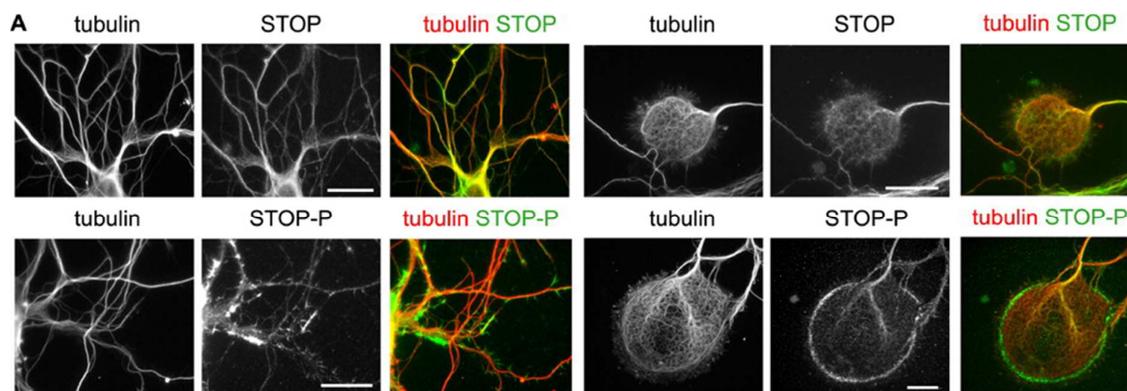


Figure 11 : Localisation de la protéine STOP phosphorylée dans des neurones d'hippocampe différenciés (d'après Baratier et al, 2006).

Double immunomarquage de la protéine STOP phosphorylée ou non sur le site P2 (STOP-P et STOP, vert) et de la tubuline (rouge) dans les boutons dendritiques ("Neuritic network") (A) ou les points de branchements axonaux ("Branching point"). La phosphorylation de STOP entraîne sa délocalisation du réseau microtubulaire.

La phosphorylation de la STOP par la CaMKII et la liaison au complexe Ca²⁺/calmoduline constituent ainsi deux moyens de régulation de sa fonction stabilisatrice des microtubules. Etant donné le rôle clé de la CaMKII au sein de l'élément post-synaptique, cette régulation serait sûrement nécessaire à l'établissement de la plasticité synaptique. Les protéines STOP semblent aussi pouvoir jouer un rôle de régulateur de la dynamique du cytosquelette, en interagissant avec les microtubules selon leur état de phosphorylation.

Dans des fibroblastes, à faible taux d'expression, N-STOP se localise au niveau de l'appareil de Golgi mais sa plus forte expression au cours du temps favorise la localisation microtubulaire et masque ainsi sa localisation golgienne. La délétion des 20 premiers acides aminés du domaine N-terminal de N-STOP supprime sa localisation golgienne à faible taux d'expression et démontre l'implication du domaine N-terminal de N-STOP dans son ciblage à l'appareil de Golgi (Gory-Faure et al., 2006). Il a été montré que N-STOP pouvait être palmitoylée et que cette modification était indispensable à son ciblage à l'appareil de Golgi (Windscheid, communication personnelle). La palmitoylation du domaine N-terminal de N-STOP pourrait médier son interaction avec des vésicules ou du matériel membranaire autres que l'appareil de Golgi et serait potentiellement importante pour sa fonction au niveau des synapses.

2.2.3 Les souris invalidées pour le gène de la protéine STOP : modèle animal pour l'étude de la schizophrénie

Des études ont mis en évidence qu'un gène associé à la schizophrénie, le gène DISC-1 code pour une protéine associée au centrosome, capable d'interagir avec des protéines associées aux microtubules (Morris et al., 2003; Porteous et al., 2006; Sawamura and Sawa,

2006; Blackwood et al., 2007; Clapcote et al., 2007; Mackie et al., 2007; Roberts, 2007). Ce résultat souligne l'implication des dérégulations du cytosquelette neuronal dans le déclenchement des maladies psychiatriques comme la schizophrénie.

L'association entre les polymorphismes du gène stop et la schizophrénie (Shimizu et al., 2006) a été soulevée chez les patients humains schizophrènes. Afin de mieux comprendre le rôle des protéines STOP et la stabilité des microtubules dans la fonction neuronales, les souris KO STOP ($S^{-/-}$) ont été développées comme modèle animal pour l'étude de la physiopathologie de la schizophrénie.

2.2.3.1 Génération des souris KO STOP

Afin d'analyser le rôle des protéines STOP au niveau de l'animal entier, des souris délétées pour le gène codant pour les protéines STOP (souris $S^{-/-}$) ont été produites dans notre laboratoire (Andrieux et al., 2002). Afin d'inhiber l'expression de toutes les isoformes de la protéine STOP, l'exon 1 du gène stop a été remplacé par recombinaison homologue avec une cassette contenant un gène rapporteur (β -galactosidase), sous le contrôle du promoteur endogène de N- et E-STOP (figure 12), suivi du gène de la tyrosine kinase conférant la résistance à la néomycine. Les souris homozygotes générées sont viables et n'expriment aucune des isoformes de protéine STOP.

2.2.3.2 Présentation des troubles schizoïdes de la souris KO STOP

- **Altérations cérébrales anatomiques et moléculaires**

Les premiers résultats obtenus *in vivo* n'ont fait le constat d'aucun défaut anatomique ou neurodéveloppemental du système nerveux central. Les couches cellulaires du glomérule du bulbe olfactif, du cervelet et de l'hippocampe sont organisées normalement ainsi que les champs de tonneaux du cortex somatosensoriel (Andrieux et al., 2002). Il existe toutefois une diminution du volume du striatum, des noyaux thalamiques et de certaines régions corticales. Aucune diminution de volume de l'hippocampe n'a été à ce jour démontrée chez les souris $S^{-/-}$ (Powell et al., 2007).

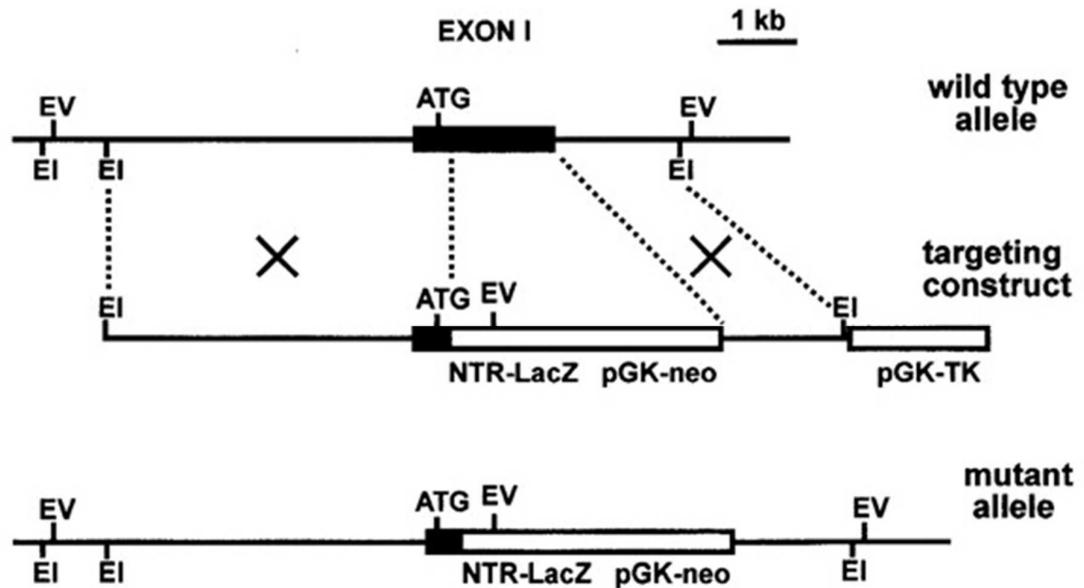


Figure 12 : construction génomique de l'inactivation du gène STOP dans la souris (d'après Andrieux et al, 2002).

Cependant ces analyses de volume région spécifique ont été menées par histologie et demandent à être confirmées par des techniques plus performantes comme la stéréologie. Au niveau du bulbe olfactif, une augmentation du nombre de glomeruli (faisceaux d'axones des neurones olfactifs) accompagnerait la diminution de la taille de ces derniers et du nombre de ramifications axonales glomérulaires. Ceci dénote un éventuel problème de maturation axonale (guidance, remaniement axonal, maturation morphologique...) directement relié à l'absence de la protéine STOP dans ces neurones (Richard et al., 2009).

Afin de déterminer si l'absence de protéine STOP engendrait des défauts dans l'organisation de la synapse, une analyse ultrastructurale des synapses de la région CA1 de l'hippocampe des souris $S^{-/-}$ a été réalisée en microscopie électronique et a révélé que le pool en vésicules présynaptiques était réduit de moitié (Andrieux et al., 2002). Par ailleurs, une diminution de l'expression de certaines protéines présynaptiques telles que la synaptophysine, GAP 43 (*Growth associated protein 43*), du transporteur vésiculaire glutamatergique de type 1 (*VGlut 1*) et de protéines postsynaptiques comme la spinophiline a été mise en évidence chez les souris $S^{-/-}$ au niveau de l'hippocampe et du cervelet (Eastwood et al., 2007).

- **Troubles comportementaux**

La délétion du gène STOP chez la souris induit des altérations comportementales sensibles aux neuroleptiques (NL) et à l'épothilone D, un agent stabilisateur des

microtubules (Andrieux et al., 2006). Parmi ces altérations, nous pouvons retrouver les 3 types de troubles comportementaux : troubles positifs, négatifs et cognitifs (désorganisés).

Parmi les troubles positifs, nous pouvons citer une hyperlocomotion basale et une hyperréactivité en réponse à un stress aigu et en réponse à l'injection d'amphétamine et une activité fragmentée : perturbation des phases de repas et de sommeil, accompagnées de transitions plus importantes entre hyperlocomotion et prostration (Andrieux et al., 2002; Brun et al., 2005).

Parmi les troubles négatifs, nous retrouvons une altération du comportement social et maternel, un retrait social sévère. De plus, ces souris présentent également des perturbations de l'intégration sensorimotrice, des troubles du réflexe inhibiteur post-stimuli (PPI : *Pre Pulse Inhibition*) (Fradley et al., 2005).

Au niveau cognitif, les souris $S^{-/-}$ présentent de nombreux déficits lors de test mettant en jeu les capacités cognitives ne pouvant être atténués par les antipsychotiques. On peut citer par exemple un déficit dans la mémoire de travail spatiale dans le paradigme du labyrinthe en Y (Begou et al., 2008) mais aussi lors d'un apprentissage spatial comme dans le test de reconnaissance d'un nouvel objet (Powell et al., 2007). Ce profil de résistance aux neuroleptiques est aussi retrouvé chez les patients humains schizophrènes (Hagan and Jones, 2005). Les anomalies retrouvées au niveau locomoteur n'apparaissent que chez les souris $S^{-/-}$ pubères (Begou et al., 2007).

- **Altérations neurochimiques**

Les souris $S^{-/-}$ présentent également une hyperréactivité dopaminergique, préférentiellement dans le système limbique (Brun et al., 2005). Alors que les concentrations basales de la dopamine (DA) extracellulaire ne sont modifiées ni dans le striatum, ni dans le Noyau accumbens (NAcc), l'efflux de DA provoqué par des stimulations électriques mimant un stimulus physiologique est sélectivement augmenté dans le NAcc. Ainsi, les altérations de l'efflux de DA affectent le système dopaminergique impliqué dans les processus de récompense et de motivation sans toucher le système dopaminergique impliqué dans le contrôle moteur. L'hyperactivité dopaminergique serait due à une libération plus importante de DA, alors que la recapture de DA et les mécanismes d'autoinhibition semblent normaux. Ces résultats semblent encore controversés par les études de Bouvrais-Veret et al, qui ne montrent aucune différence dans les densités des transporteurs vésiculaires et non vésiculaires dopaminergiques ainsi que des récepteurs D_1 . Par contre, la quantité de récepteurs D_2 et D_3 et le taux endogène de dopamine diminueraient dans plusieurs régions ainsi que la recapture et ce, spécifiquement dans le NAcc (Bouvrais-Veret et al., 2007).

Au niveau de l'activité cérébrale de base, le métabolisme glucidique semble significativement augmenter au niveau du cortex olfactif, de l'hypothalamus ventromédian et antérolatéral, de l'aire segmentale ventrale et de la substance noire compacte. L'hyperactivité basale de ces structures reflète bien, de façon générale, l'hyperdopaminergie observée, l'altération des processus olfactifs et les troubles du sommeil observés chez les souris $S^{-/-}$ et les patients schizophrènes humains. Des augmentations non significatives du métabolisme glucidique (9 à 19%) sont aussi retrouvées dans le système olfactif, la CA1, et le raphé dorsal (Hanaya et al., 2008).

La réduction du pool vésiculaire glutamatergique dans les synapses va en faveur de l'hypothèse hypoglutamatergique de la schizophrénie. En effet, les neurones des régions CA1 de l'hippocampe présentent une neurotransmission basale et une "paired-pulse facilitation" normale mais des défauts sévères des processus de plasticité synaptique : potentialisation et dépression à long terme (*LTP* et *LTD*) et potentialisation à court terme (*PTP*) (Andrieux et al., 2002). Une étude en HPLC avec des marqueurs radioactifs a démontré que la diminution du relargage glutamatergique dans les fentes synaptiques provoquait à première vue une activation moindre des récepteurs post-synaptiques ainsi qu'une augmentation du métabolisme glutaminergique au voisinage des parties post-synaptiques (Brenner et al., 2007). Nous retrouvons aussi cette caractéristique hypoglutamatergique chez les patients humains schizophrènes qui présentent à la fois une hypoactivité hippocampale ainsi qu'une réduction du métabolisme glutamatergique (voir paragraphe « symptomatologie cérébrale et intégrative de la schizophrénie »).

- **Effets des neuroleptiques**

Les souris $S^{-/-}$ ont été traitées à long terme avec des neuroleptiques (*NL*) typiques (chlorpromazine, haloperidol) et atypiques (rispéridone, clozapine), couramment utilisés pour le traitement clinique de la schizophrénie humaine. Ces agents antipsychotiques puissants, antagonistes des récepteurs dopaminergiques et des recapturs de la sérotonine, sont capables de bloquer la transmission dopaminergique et au contraire d'augmenter le taux de sérotonine dans le cerveau. Ces traitements ont induit des améliorations des déficits comportementaux et synaptiques des souris $S^{-/-}$ en cohérence avec leurs effets cliniques propres (Andrieux et al., 2002; Begou et al., 2008; Delotterie et al.).

- **Conclusion**

La souris $S^{-/-}$, modèle animal pour l'étude de la schizophrénie présente donc à la fois des troubles anatomiques cérébraux, des troubles neurochimiques et des déficits comportementaux largement équivalents aux patients schizophrènes humains. L'utilisation

d'un bon modèle murin de schizophrénie comme les $S^{-/-}$ pour l'investigation des processus moléculaires, cellulaires et tissulaires à l'origine des troubles anatomiques et fonctionnels cérébraux permet d'approfondir la connaissance concernant la nature des altérations neurodéveloppementales responsables de la mise en place de la schizophrénie.

2.2.4 Autres modèles animaux pour l'étude de la schizophrénie

2.2.4.1 Modèles pharmacologiques

Les modèles pharmacologiques sont les premiers modèles animaux développés à partir des effets psychomimétiques de certaines drogues et des dysfonctionnements neurochimiques observés dans la schizophrénie. On peut par exemple citer les modèles dopaminergiques reposant sur l'injection d'agonistes dopaminergiques comme l'amphétamine ou la métamphétamine. Cette injection provoque chez le rat des troubles mimant les symptômes positifs de la schizophrénie (Hyperlocomotion, stéréotypies), des troubles du traitement de l'information (déficit du PPI) (Bakshi and Geyer, 1995; Arai et al., 2009) qui peuvent être reversés lors de l'utilisation de neuroleptiques.

Il existe aussi des modèles reposant sur la perturbation du système glutamatergique par l'injection d'antagonistes non compétitifs des récepteurs NMDA comme la kétamine et le phencyclidine (*PCP*) (Jentsch and Roth, 1999). Ces modèles présentent un panel de troubles étendus incluant les différentes sphères de la symptomatologie de la schizophrénie. On peut par exemple citer des troubles de type positif (augmentation de l'activité locomotrice, stéréotypie), de type attentionnel (déficit du PPI), de type cognitif (déficits des apprentissages associatifs et mémoire de travail).

Ces modèles présentent un grand intérêt par leur facilité de mise en œuvre et dans la similarité des symptômes pouvant être induit chez l'animal. Néanmoins, la schizophrénie est une pathologie avec un décours temporel chronique et évolutif et ce paramètre reste un facteur limitant pour ce type de modèle.

2.2.4.2 Modèles neurodéveloppementaux

Avec la mise en place de l'hypothèse neurodéveloppementale, la conception des modèles animaux pour étudier la schizophrénie a évolué. Certains modèles animaux ont été mis au point en altérant le développement cérébral précoce afin de provoquer des troubles mimant les symptômes de la schizophrénie. Différentes modalités ont été utilisées dans la modélisation animale : perturbations cytoarchitecturales, manipulation génétique et modèles basés sur l'exposition maternelle à différents types de stress.

- **Modèles lésionnels**

Ces modèles reposent sur des perturbations précoces de la connectivité et de la plasticité neuronale. Un des modèles le plus reconnu est le rat avec une lésion néonatale de l'hippocampe ventral (LNHV), développé en 1993 par Barbara Lipska, basé sur une perturbation cérébrale précoce aboutissant à une dysconnectivité cortico-limbique. Cette perturbation est réalisée par l'injection bilatérale d'acide iboténique dans l'hippocampe ventral chez le rat à sept jours. Ce modèle présente de multiples altérations pouvant être liées aux différentes dimensions symptomatologiques présentes chez les patients schizophrènes (Lipska et al., 1993; Lipska and Weinberger, 1993). Pendant la période pré-pubère, les animaux présentent des troubles au niveau de l'apprentissage spatial et de la mémoire de travail et des déficits d'interaction sociale. A la puberté, des troubles mimant plutôt la dimension positive, comme l'hyperréactivité locomotrice en réponse à l'injection d'amphétamine, se rajoutent à cet ensemble d'anomalies. Le rat LNHV est un modèle robuste largement validé dont l'utilisation est limitée, au niveau pratique, par la difficulté de mise en œuvre. En effet, au niveau conceptuel, les lésions tissulaires présentes chez ce modèle sont beaucoup trop étendues par rapport aux descriptions faites chez les patients schizophrènes.

- **Modèles génétiques**

Mutants relatant certains aspects physiopathologiques de la schizophrénie

Ces mutants ont été générés en se basant sur les différentes hypothèses physiopathologiques de la schizophrénie : maladie de la connectivité neuronale à composante hyperdopaminergique et hypoglutamatergique (Desbonnet et al., 2009).

Ainsi tout un panel de mutants pour des protéines impliquées dans la signalisation glutamatergique a été créé : mutants partiels pour les sous unités des récepteurs glutamatergiques NR₁ ou NR₂, le transporteur de la glycine GlyT1, SynGAP une protéine associée aux récepteurs NMDA, ou bien délétion complète du gène codant pour les transporteurs du glutamate GLAST (*glial glutamate and aspartate transporter*). Ces différents mutants présentent tous des défauts d'interaction sociale, de mémorisation et de l'hyperactivité (figure 13). Leur réponse aux traitements antipsychotiques demeure elle incertaine (Miyamoto et al., 2001; Ballard et al., 2002; Karlsson et al., 2008; Labrie et al., 2008; Guo et al., 2009; Karlsson et al., 2009).

	Lateral ventricular volume	Synaptic plasticity	Anxiety	Novelty induced activity	Cognition				Sociability			Psychopharmacology		
					Executive function	Working/spatial memory	Attention	PPI	Social recognition	R-1 aggression	SI	Sensitivity to psychostimulants ^a	Sensitivity to stress	Responsivity to antipsychotics
D2R Tg	-	-	-	-	↓ [96]	↓ [96]	-	-	-	-	-	-	-	-
NR1 -/-	-	-	-	↑ [40,51,122]	-	-	-	↓ [40,51,125]	-	-	↓ [122]	↑ [122,125]	-	↑ [43,51,122]
GluR1 -/-	-	-	-	↑ [121]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑ [121]
GlyT1 cKO	-	-	-	↑ [182]	-	↑ [182]	↑ [182]	-	-	-	-	↓ [182]	-	-
Grin1 ^{D481N/K489Q}	-	-	-	↑ [7]	↓ [7]	↓ [104]	↓ [7]	↑ [104]	-	-	↓ [104]	↓ [7]	-	↓ [7,104]
SynGAP +/-	-	-	↓ [63]	↑ [63]	↓ [63]	↓ [63]	↓ [63]	↓ [63]	↓ [63]	-	↓ [63]	↓ [63]	-	↓ [63]
SRac -/-	-	-	↑ [8]	↑ [8]	↓ [8]	-	↓ [8]	-	-	-	-	-	-	-
GLAST KO	-	-	-	↑ [92,93]	-	-	-	↓ [93]	↓ [93]	-	↓ [93]	↑ [92]	-	↑ [92]
Cplx1 -/-	-	-	-	-	-	-	-	↓ [38]	↓ [38]	↓ [38]	↓ [38]	-	-	-
FGFR1 Tg	-	-	-	-	-	-	-	↓ [97]	-	-	-	-	-	↑ [97]
LPA -/-	-	-	-	-	-	-	-	↓ [71]	-	-	-	-	-	-
Nurr1 +/-	-	-	-	↑ [151]	-	-	-	↓ [44]	-	-	-	↑ [151]	↑ [151]	↑ [151]
Reeler +/-	-	↓ [169]	↓ [102]	-	↓ [17]	↓ [102]	↓ [102]	↓ [169]	↓ [169]	↓ [169]	↓ [169]	↑ [169]	↓ [169]	↑ [151]
STOP -/-	↓ [3,148]	↓ [3,43]	↑ [3]	↑ [9,14,51,148]	-	↓ [14]	-	↓ [51]	-	↓ [3]	↓ [3]	↓ [9,14]	-	↑ [3,9,51]
Synapsin II -/-	-	-	-	-	-	-	-	↓ [42]	-	-	↓ [42]	-	-	-
AKT1 -/-	-	↓ [105]	-	↓ [105]	-	↓ [105]	-	-	-	-	-	↑ [105]	-	-
COMT +/-	-	-	↑ [140]	↓ [6,57]	-	↑ [5,140]	-	↓ [57,140]	↓ [5]	↑ [57]	↓ [5]	-	-	-
COMT -/-	-	-	↓ [57,140]	↓ [6,57,83]	-	↓ [5,140]	-	↓ [57,140]	↓ [5]	↓ [57]	↓ [5]	↓ [83]	↑ [140]	-
COMT-ValTg	-	-	↓ [140]	↓ [140]	-	↓ [140]	↓ [140]	↓ [140]	↓ [140]	↓ [140]	↓ [140]	↓ [140]	↓ [140]	-

Figure 13 : Tableau récapitulatif des troubles comportementaux et anatomiques des modèles murins relatant certains aspects de physiopathologiques de la schizophrénie (Desbonnet et al., 2009).

↑ : augmentation significative par rapport aux souris sauvages. ↓ : diminution significative par rapport aux souris sauvages, = : pas de différence, - : non reporté, PPI : prepulse inhibition, R-1 : resident-intruder, SI : social interaction.

Afin de mimer l'hyperdopaminergie au sein de la boucle cortico-striato-thalamo-corticale, un modèle animal surexprimant le récepteur D₂ au niveau du striatum a été généré. Cette souris présente de nombreuses altérations dans les tests cognitifs et d'apprentissage et des troubles comportementaux très discrets (Guillin et al., 2007).

Plusieurs modèles animaux ont été aussi générés dans le but de comprendre le rôle de l'altération synaptique générale dans la mise en place de la schizophrénie. Pour ce faire, plusieurs protéines synaptiques ont été délétées dans ces animaux : le récepteur du FGF (*Fibroblast Growth Factor 1*), l'acide lysophosphatidique 1 (rôle dans le développement du système nerveux central et la myélinisation), Nurr1 (facteur de transcription des neurones dopaminergiques), la reeline (protéine extracellulaire impliquée dans le développement du système nerveux et exprimée par les neurones GABAergiques) et la synapsine II (protéine spécifique des vésicules synaptiques jouant dans le relargage des neurotransmetteurs). Ces mutants ne miment que les troubles cognitifs et certains symptômes négatifs (Brigman et al., 2006; Eells et al., 2006; Klejbor et al., 2006; Dyck et al., 2007).

Mutants dont les gènes sont associés aux risques de schizophrénie

La mise en évidence de nombreux gènes de susceptibilité pour la schizophrénie a permis d'aiguiller les équipes de recherche dans la conception de modèles transgéniques. Ce sont les gènes dont nous avons discuté dans la partie précédente concernant l'hypothèse neurodéveloppementale de la schizophrénie (chapitre 2.1.2) : DAO, DISC1, dysbindine, neuréguline, et certains gènes de la partie chromosomique 22q 11.2 délétée chez les patients schizophrènes. Nous nous sommes restreints à décrire les différents modèles génétiques des formes de DISC1 (figure 14).

Par ailleurs, un grand nombre de souris exprimant différentes formes de DISC1 ont été générées et présentent, à chaque fois, une combinaison de troubles comportementaux très variés. Des mutations dirigées de DISC1, à l'aide d'agents chimiques, provoquent des phénotypes distincts dans les souris selon les mutations (Clapcote et al., 2007). La première mutation (Q31L) produit un comportement dépressif, de l'anhédonie ainsi qu'une altération de l'interaction sociale. Certains troubles peuvent, par ailleurs être atténués par le bupropion, un antidépresseur. L'autre mutation de DISC1 (L100P) chez la souris s'associe à des défauts comportementaux majeurs associés à la schizophrénie incluant des troubles du PPI, de l'interaction sociale, et de la mémoire de travail ainsi que de l'hyperactivité. De plus, les antipsychotiques agissent sur les troubles présentés par la souris à mutation L100P, alors qu'ils n'ont aucun effet sur les souris à mutation Q31L. Ces données appuient l'hypothèse du partage de la vulnérabilité génétique et des complexes moléculaires impliqués dans la schizophrénie et la dépression.

	Lateral ventricular volume	Myelination	Synaptic plasticity	Anxiety	Novelty induced activity	Cognition				Sociability			Psychopharmacology			
						Executive function	Working memory	Attention	PPI	Social recognition	R-1 aggression	SI	Increased sensitivity to psychostimulants	Increased sensitivity to stress	Responsivity to antipsychotics	
DAO ^{-/-} d6y	-	-	-	-	↓*	-	-	-	=	-	-	-	-	-	-	-
DISC1 deletion	-	-	=	-	-	-	↓	-	[2]	-	-	-	-	↓	[2,72,74]	-
DISC1 Q31 L	-	-	[103]	-	=	-	↓	[100,103]	-	-	-	-	-	-	-	-
DISC1 L100P	-	-	-	-	=	-	↓	-	-	-	-	-	↓	[29]	-	↑
DISC1-C Tg	-	-	-	-	↑	-	↓	[29]	[29]	↓	[29]	-	-	-	-	↑
DISC1-DN	↑	-	-	-	↑	-	↓	[111]	-	-	-	-	↓	[111]	-	↑
DISC1-hu Tg	[80]	-	-	-	[80]	-	↓	[80]	-	↓	[29]	-	↓	[80]	-	[80]
FEZ1 -/-	[146]	-	-	-	[146]	-	↓	[146]	-	[146]	[146]	-	↓	[146]	-	-
Dysbindin sdy	-	-	[153]	-	[153]	-	↓	[153]	-	[153]	-	-	↓	[153]	↑	[153]
NRG1-TM +/-	-	-	-	-	↑	-	↓	[49,76]	-	-	-	-	↓	[49,76]	-	-
NRG1 III +/-	-	-	-	-	[138]	-	↓	[158]	-	↓	[137]	↑	[138]	↑	[12]	↑
NRG1 Ig +/-	[25]	-	-	-	[25]	-	↓	[25]	-	↓	[25]	-	-	-	-	-
BACE1 -/-	-	-	-	-	[149]	-	↓	[149]	-	-	-	-	-	-	-	↑
BACE1-1 +/-	-	↓	-	-	[85]	-	↓	[36]	-	-	-	-	-	-	-	-
ErbB4 +/-	-	-	↓	-	[111]	-	↓	[59,158]	-	-	-	-	-	-	-	-
ErbB4-oligo	-	↓	-	-	[152]	-	↓	[59,152]	-	-	-	-	↓	[152]	↑	[152]
Calcineurin -/-	-	-	↓	-	[183]	-	↓	[120]	-	↓	[183]	↓	[120]	↓	[120]	↑
RGS4-deficient	-	-	-	-	[61]	-	↓	[61]	-	↓	[61]	-	-	-	-	-
Gα _s -deficient	-	-	-	-	[21]	-	↓	[21]	-	↓	[21]	-	-	-	↑	[21]
PLC-β1 -/-	-	-	-	-	[117]	-	↓	[117]	-	-	-	-	-	-	-	↓
Chromosome 22 deletion genes																
PRODH -/-	-	-	-	-	[55]	-	↓	[55,141]	-	↓	[141]	-	-	-	↓	[141]
Zdhhc8 +/-	-	-	-	-	[127]	-	↓	[127]	-	↓	[127]	-	-	-	-	-
Zdhhc8 -/-	-	-	-	-	[127]	-	↓	[127]	-	↓	[127]	-	-	-	-	-
Nogo +/-	-	-	-	-	[82]	-	↓	[82]	-	↓	[82]	-	-	-	-	↓
Nogo -/-	-	-	-	-	[82]	-	↓	[82]	-	↓	[82]	-	-	-	↓	[82]

Figure 14 : Tableau récapitulatif des troubles comportementaux et anatomiques des modèles murins mutants dont les gènes sont associés aux risques de schizophrénie (Desbonnet et al, 2009).

↑ : augmentation significative par rapport aux souris sauvages. ↓ : diminution significative par rapport aux souris sauvages, = : pas de différence, - : non reporté, PPI : prepulse inhibition, R-1 : resident-intruder, SI : social interaction.

Des souris dont l'expression inductible, sous le promoteur de la CamK II, de la forme humaine de DISC1 dont 25 paires de bases de l'exon 6 ont été tronquées, ont été générées. L'expression de cette forme tronquée ne provoque pas d'effet majeur au niveau du développement cérébral, mais les souris males, contrairement aux femelles, présentent une activité locomotrice exacerbée, une réduction de l'interaction sociale, une augmentation de l'agressivité associée à une altération de la mémoire de travail visuelle (Koike et al., 2006; Pletnikov et al., 2008). Ces altérations comportementales sont accompagnées d'un élargissement des ventricules latéraux cérébraux et d'une réduction de l'arborisation dendritique des neurones du cortex.

Une autre souris mutante pour le gène de DISC1 a été générée. Dans ces souris, seul le fragment C terminal de DISC1 est exprimé. L'expression de cette forme tronquée à 7 jours post-natals est associée à des déficits dans la mémoire de travail et une interaction sociale réduite. De façon intéressante, cette forme induit aussi des comportements dépressifs. En revanche, l'expression de ce fragment à l'âge adulte n'induit aucun phénotype, indiquant que DISC1 serait impliqué dans les phases précoces du neurodéveloppement (Li et al., 2007).

Les phénotypes des souris homozygotes pour l'expression d'une forme dominante négative de DISC1, sous le promoteur de la CamK II sont encore différents des autres mutants pour DISC1 : ces souris présentent une activité locomotrice augmentée mais ni le PPI, ni la mémoire de travail, ni la mémoire visuelle sont altérés (Hikida et al., 2007). Cependant, un léger trouble de la mémoire olfactive et un comportement dépressif sont retrouvés chez les souris âgées de 6 semaines, mais disparaissent à 3 mois.

La délétion conditionnelle de ce gène au niveau de régions cérébrales diverses et à différents stades du neurodéveloppement produit une constellation de déficits de migration neuronale (Kamiya et al., 2005). Cela a permis de comprendre que cette protéine est impliquée dans les processus de migration et de croissance axonale au cours du développement. En effet, DISC1 semble jouer un rôle important dans le neurodéveloppement embryonnaire et la plasticité structurale via son interaction avec de nombreuses protéines comme la phosphodiesterase-4B, FEZ1, NudEL, et LIS1 (Duan et al., 2007).

Ainsi la variété phénotypique entre ces mutants murins pour le gène de DISC1 illustre bien la complexité du rôle de ce gène au niveau moléculaire (isoformes multiples, interaction avec les partenaires protéiques dans les processus à l'origine de la mise en place des psychopathologies), spatial (régions cérébrales, types cellulaires) et temporel (stades de développement). L'élucidation du rôle de DISC1 dans ces différentes dimensions sera nécessaire à la caractérisation de la pertinence de ce gène dans les maladies psychiatriques.

Enfin, et de manière générale, la caractérisation de ces différents modèles génétiques nous amène à penser que la mise en place de la schizophrénie résulte sûrement d'altérations multiples et coordonnées de différents processus (apparentées ou non à des modifications génétiques spécifiques). Ces modèles génétiques ne sont pas des modèles, *in fine*, de schizophrénie, mais plutôt des modèles de rôles fonctionnels de gènes susceptibles d'être associés à la schizophrénie ou bien à des processus neuronaux impliqués dans la physiopathologie de la schizophrénie (notion d'endophénotypes). Ces modèles nous permettent, à ce jour, de bien caractériser le rôle de ces gènes dans la mise en place des endophénotypes apparentés à la schizophrénie. D'un autre côté, l'implication de facteurs étiologiques dans l'altération du développement du système nerveux permettant la mise en place de la maladie est maintenant bien connue. Une meilleure compréhension de la contribution complémentaire des gènes de susceptibilité et des facteurs étiologiques reste cependant nécessaire et indispensable.

- **Modèles de stress périnatal**

Afin d'être en accord avec l'hypothèse neurodéveloppementale, des modèles mettant en œuvre des stress de différents types durant la période anté- ou post-natale ont été développés. Ces modèles s'intéressent aux conséquences que peut produire à long terme un stress périnatal sur le développement cérébral ainsi que sur les réponses comportementales observées à l'âge adulte. Différents types de paradigmes ont été mis au point chez les rongeurs comme la séparation maternelle (Ellenbroek et al., 1998), l'isolement social (Geyer et al., 1993; Fone and Porkess, 2008) ou encore l'exposition de la mère gestante à des stress multiples répétés de façon chronique (Lee et al., 2007). Ces protocoles induisent de nombreux changements hormonaux, neurochimiques et comportementaux. Au niveau neurochimique, le système dopaminergique semble être affecté (Geyer et al., 1993) tandis qu'au niveau comportemental, se retrouvent une hyperactivité locomotrice en réponse à un nouvel environnement, des troubles attentionnels (déficit du PP1) et des déficits d'apprentissage (Geyer et al., 1993; Heidbreder et al., 2000). Par ailleurs, il a été rapporté que les effets de la séparation maternelle sur la réactivité des animaux à l'âge adulte étaient fortement influencés par des facteurs génétiques aussi bien que non génomiques.

2.3 La neurogenèse adulte et les psychopathologies

Pendant plus d'un siècle, on caractérisa la neurogenèse comme un processus restreint aux développements embryonnaire et prénatal. En effet, le dogme scientifique selon lequel « Dans le système nerveux central adulte, les projections nerveuses sont fonctionnelles, figées et immuables. Tout meurt, rien n'est régénéré » (Ramon y Cajal, 1913) a écarté toute recherche scientifique chez l'adulte. Bien que des travaux pionniers aient suggéré, dès les années 60-70, l'existence d'une prolifération cellulaire, ce n'est que depuis 15 ans que ce dogme s'est totalement effondré et que la notion de neurogenèse adulte a été acceptée par la communauté scientifique. L'émergence de nouvelles techniques (traitements à la 5-bromo-3'-déoxyuridine (BrdU) et la thymidine tritiée) permettant de suivre le devenir de cellules en division, a joué un rôle majeur dans ces évolutions (Altman and Das, 1965; Kaplan and Hinds, 1977). Ces méthodes ont permis de montrer l'existence d'une neurogenèse adulte dans le cerveau de tous les vertébrés avec, cependant, des différences notables d'un groupe évolutif à l'autre. Cette activité germinative adulte se produit en effet dans des régions limitées chez les mammifères et les oiseaux et les poissons. La finalité de cette génération de nouveaux neurones à l'âge adulte via la NGA (neurogenèse adulte) a été longtemps controversée mais son implication dans les processus de mémorisation et de plasticité synaptique a bien été caractérisée (Shors et al., 2002; Toro and Deakin, 2007). Par ailleurs, la description des mécanismes sous-tendant la neurogenèse adulte pourrait

conduire à une meilleure compréhension des processus favorisant l'apparition de maladies cérébrales et au développement de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, une régulation fine de ce processus semble primordiale. Dans certaines maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer et la Chorée d'Huntington, la NGA est suractivée dans l'hippocampe (Phillips et al., 2005). A l'opposé, dans des maladies psychiatriques, comme la dépression chronique et la schizophrénie, la NGA semble être cette fois-ci déficiente (Santarelli et al., 2003; Reif et al., 2006). Cependant, personne n'est encore arrivé à démontrer l'éventuelle implication de la NGA dans les maladies psychiatriques.

2.3.1 Les cellules gliales radiaires (la glie radiaire)

2.3.1.1 Historique de la caractérisation de la glie radiaire

La découverte et la description des cellules gliales radiaires ont débuté il y a plus d'un siècle. C'est Golgi, en 1873, grâce à sa technique d'imprégnation au nitrate d'argent, qui mit en évidence cette glie dans la moelle épinière chez l'embryon. Dix ans après, Magini confirma les observations de Golgi en étudiant le cortex cérébral de différents mammifères et montra aussi que ces cellules n'étaient plus présentes chez l'adulte. Il décrit aussi un autre type cellulaire avoisinant les cellules radiaires et suggéra que ces cellules pouvaient être des précurseurs neuronaux, les neuroblastes. His puis Cajal suggérèrent ensuite que les cellules gliales radiaires pourraient servir de support de migration aux neuroblastes. Suite à ces travaux, les cellules radiaires furent négligées pendant de longues décennies. En 1950, le développement de la microscopie électronique et des techniques d'autoradiographie à la thymidine tritiée a permis la reprise de ces travaux, et le terme de glie radiaire apparut alors (Bentivoglio and Mazzarello, 1999). En 1972, en combinant microscopie et imprégnation de Golgi, Rakic identifia et décrivit les cellules gliales radiaires lors de l'étude des phases initiales de l'histogenèse du cerveau (figure 15). Le rôle des cellules gliales radiaires dans le développement du système nerveux central tel qu'il est actuellement reconnu chez tous les vertébrés émergea alors (Rakic, 2003).

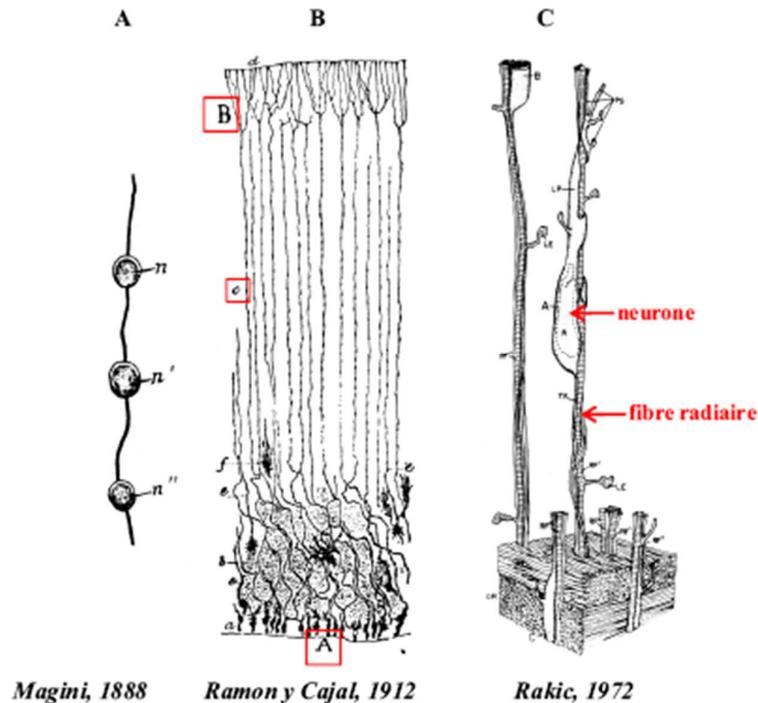


Figure 15 : Historique de la description des cellules gliales radiaires et de leur relation avec les neurones D'après Bentivoglio et Mazarello, 1999.

A : Dessin de Magini après observation de cellules d'un cerveau de fœtus avec la technique d'imprégnation de Golgi, schématisant trois noyaux (notés n, n', n'') entourés de fin cytoplasme et « insérés » le long d'un filament.
B : Dessin de glie radiaire par Ramon y Cajal représentant des cellules épithéliales et neurogliales d'un cortex cérébral de lapin de quelques jours. *A* : corps cellulaires des cellules épithéliales *B* : arborisations de ces cellules, *c* : fibres radiaires.
C : Reconstruction tridimensionnelle illustrant les relations existant entre les fibres radiaires et les neurones migrant le long de ces fibres dans un cortex de primate.

2.3.1.2 Définition et caractéristiques de la glie radiaire

Les cellules gliales radiaires, par opposition aux neurones, appartiennent classiquement à la catégorie des cellules gliales. Ces dernières se divisent elles-mêmes en deux groupes : la microglie (les macrophages du cerveau) et la macroglie qui elle-même regroupe les cellules gliales radiaires, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules épendymaires. Les cellules gliales radiaires sont bien caractérisées en raison de leur morphologie particulière et de leurs caractéristiques « gliales ». Ce sont des cellules non neuronales dérivées des cellules neuroépithéliales issues du développement du tube neural. Bien que de morphologie identique aux cellules épithéliales dont elles dérivent, elles diffèrent de ces dernières par leurs propriétés gliales et l'expression spécifique de marqueurs astrogliaux (Gotz and Barde, 2005). D'un point de vue morphologique, le noyau de ces cellules est de forme ovale et le corps cellulaire est positionné en bordure de ventricule. De

plus, ces cellules possèdent des extensions bipolaires avec un prolongement cytoplasmique court accolé au ventricule et un prolongement cytoplasmique long traversant le parenchyme cérébral qui se termine en une structure appelée « pied » à la périphérie du cerveau (Rakic, 2003; Gotz and Huttner, 2005). En outre, les cellules gliales radiaires ont des caractéristiques communes avec les astrocytes. En effet, elles présentent des granules de glycogène dans leur cytoplasme et partagent des caractéristiques ultrastructurales. Enfin, les cellules gliales radiaires et les astrocytes expriment des marqueurs spécifiques dont certains sont communs, mais qui peuvent toutefois varier selon l'espèce et la région cérébrale.

L'expression de différents marqueurs de cellules gliales radiaires a été particulièrement étudiée durant le développement chez les mammifères (figure 16). Ces cellules expriment une variété de molécules qui sont également caractéristiques des astrocytes. En effet, ces deux types cellulaires expriment un transporteur au L-glutamate et L-aspartate spécifique des astrocytes (*GLAST*) (Hartfuss et al., 2001), la glutamine synthase (*GS*) (Akimoto et al., 1993), la sous-unité β de la protéine S100 qui est une protéine de liaison au calcium. Ces cellules expriment également la GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), qui n'est cependant pas exprimée dans les cellules gliales radiaires des rongeurs (Sancho-Tello et al., 1995), la tenascine, une molécule de la matrice extracellulaire (Gotz et al., 1998), la vimentine, une protéine des filaments intermédiaires (Schnitzer et al., 1981) et la BLBP (*brain lipid binding protein*), qui est une protéine de transport des acides gras (Anthony et al., 2004). En fait, si aucune de ces molécules n'est spécifique aux cellules gliales radiaires et aux astrocytes, c'est la combinaison de ces différents marqueurs associée à la morphologie particulière de ces cellules qui les caractérise. Il est également important de préciser que les cellules gliales radiaires n'expriment pas tous ces marqueurs au même moment, mais qu'il existe une hétérogénéité dans l'expression de ces molécules en fonction des régions et du stade de développement.

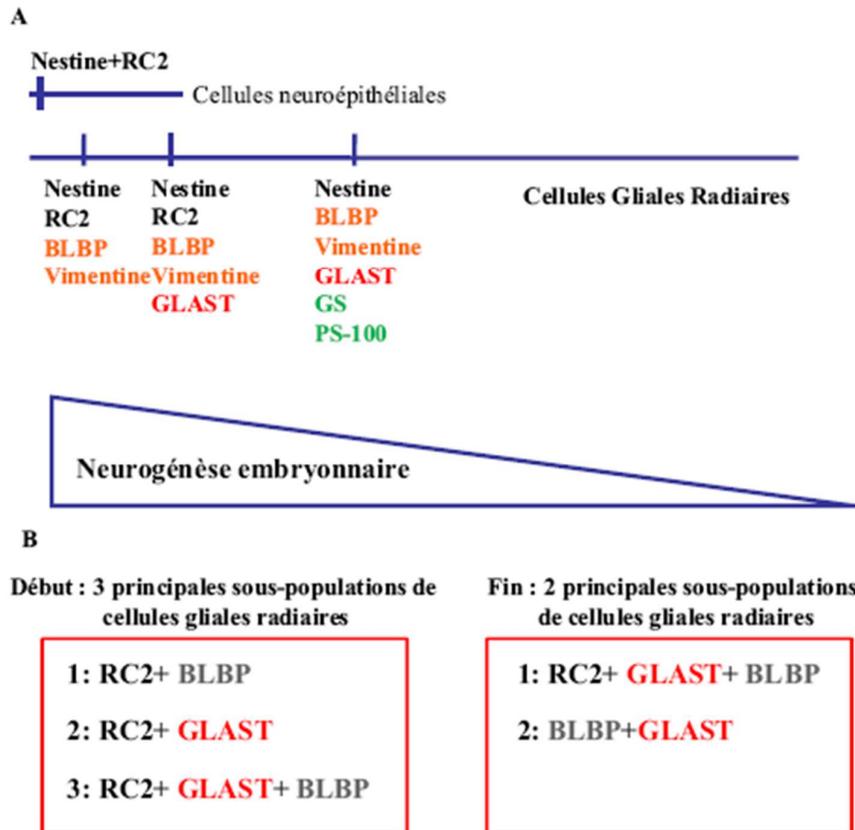


Figure 16 : Récapitulatif des différents marqueurs de cellules gliales radiaires.

A : Illustration schématique de l'ordre d'apparition des marqueurs des cellules gliales radiaires durant le développement embryonnaire. RC2 : forme posttraductionnelle de la Nestine ; BLBP (brain lipid binding protein) ; GLAST : un transporteur au L-glutamate et L-aspartate ; GS (glutamine synthase) ; PS-100 : sous-unité β de la protéine S100, protéine de liaison au calcium. **B :** Illustration des principales sous-populations de cellules gliales radiaires au cours du développement. Trois sous-populations sont observées au début de la neurogenèse. A la fin de la neurogenèse embryonnaire, une seule de ces trois populations est présente tandis qu'une nouvelle apparaît (BLBP+GLAST).

2.3.1.3 Rôle des cellules gliales radiaires

- **Support de migration pour les neurones**

En plus d'être bien caractérisées par leur morphologie et par l'expression spécifique de différents marqueurs, les cellules gliales radiaires sont connues depuis longtemps pour leur rôle majeur dans la neurogenèse embryonnaire. En effet, la fonction première reconnue de ces cellules est d'intervenir dans la migration des neurones en cours de différenciation (figure 17).

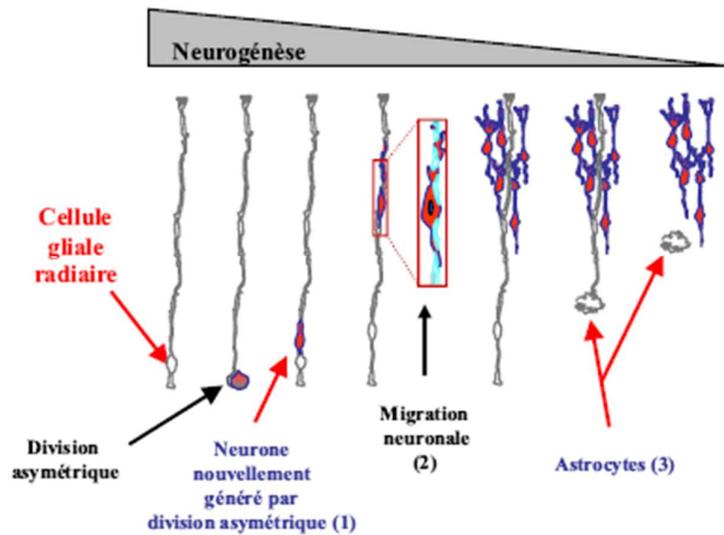


Figure 17 : Schéma représentant le rôle des cellules gliales radiaires pendant la neurogénèse embryonnaire du cortex de souris. D'après (Noctor et al., 2002).

Les cellules gliales radiaires génèrent, par division asymétrique, des neurones (1) qui utilisent alors les prolongements des cellules gliales radiaires (2) pour migrer vers leur localisation finale. A la fin de la neurogénèse, les prolongements se rétractent et les cellules gliales radiaires se différencient alors en astrocytes (3).

Les neurones nouvellement générés dans le cortex cérébral chez les mammifères ne sont pas générés dans le cortex lui-même, mais naissent à proximité des ventricules et migrent vers la zone sous-ventriculaire en utilisant les prolongements radiaires comme support de migration afin de gagner leur destination finale (Rakic, 2003). La morphologie des cellules gliales radiaires permet aux neurones de coloniser différentes régions cérébrales dans la mesure où les très longs prolongements radiaires (jusqu'à plusieurs millimètres chez le singe) sont attachés à la surface du cerveau, permettant ainsi de guider les neurones (Hatten, 1999). L'utilisation et l'émergence de nouvelles techniques et de marqueurs moléculaires ont ainsi permis de confirmer ce rôle de support de migration des nouveaux neurones, mais également de mettre en évidence la présence de molécules de surface (neuréguline, intégrines) présentes dans les neurones post-mitotiques et permettant la reconnaissance et l'adhésion à la surface adjacente des fibres radiaires (Hatten, 2002; Rakic, 2003).

- **Cellules progénitrices neuronales : Glie radiaire puis astrocytes germinatifs**

Pendant le développement embryonnaire

Pendant de nombreuses années, la fonction des cellules gliales radiaires demeura restreinte à la migration neuronale. En effet, la morphologie si particulière de ces cellules si hautement différenciées avec deux process, dont l'un traversait le parenchyme cérébral pour « s'attacher » à la surface du cerveau, faisait douter de leur capacité à se diviser. Cependant, au début des années 2000, différentes études réalisées chez les mammifères ont remis en cause l'unique fonction des cellules gliales radiaires comme support de migration et ont émis l'hypothèse que les cellules gliales radiaires et les cellules progénitrices neurales (astrocytes germinatifs) étaient, en fait, une même population (Malatesta et al., 2000; Noctor et al., 2001). Plusieurs travaux ont permis de démontrer clairement que les cellules gliales radiaires étaient des cellules progénitrices neuronales qui, par division asymétrique, génèrent des neurones qui vont migrer le long des prolongements radiaires (figure 17). A la fin de la neurogenèse embryonnaire, les prolongements radiaires se rétractent et les cellules se différencient en astrocytes (Noctor et al., 2002). Des études utilisant un rétrovirus ont montré que les cellules gliales radiaires constituent la majorité voire la totalité des cellules progénitrices neuronales dans le cortex cérébral pendant le développement (Hartfuss et al., 2001; Noctor et al., 2002; Noctor et al., 2004). De plus, après injection de BrdU, un analogue de la thymidine s'incorporant pendant la phase S, seules les cellules GFP-positives correspondant à des cellules gliales radiaires ont incorporé la BrdU, suggérant donc que seules les cellules gliales radiaires ont la potentialité de constituer des cellules progénitrices. Des marquages immunohistochimiques en combinant BrdU et des marqueurs de cellules gliales radiaires comme la vimentine, RC2, GLAST et BLBP, ont démontré ainsi que la majorité voire la totalité des cellules en phase S (BrdU positives) présentes dans la zone ventriculaire (ZSV) exprimaient ces marqueurs et confirment, une fois de plus, que les cellules en phase S dans la ZSV embryonnaire correspondaient à des cellules gliales radiaires (figure 18).

In vitro, l'isolation par cytométrie en flux de cellules gliales radiaires de souris GFAP-GFP générées a confirmé leur nature de cellules progénitrices neuronales (Malatesta et al., 2000; Malatesta et al., 2003). Ces travaux ont montré que 60 à 70% des cellules gliales radiaires isolées génèrent seulement des neurones, d'autres génèrent uniquement des cellules gliales radiaires, enfin, une dernière partie de ces cellules donne naissance à la fois à des neurones et à des cellules gliales (astrocytes ou oligodendrocytes) (figure 18).

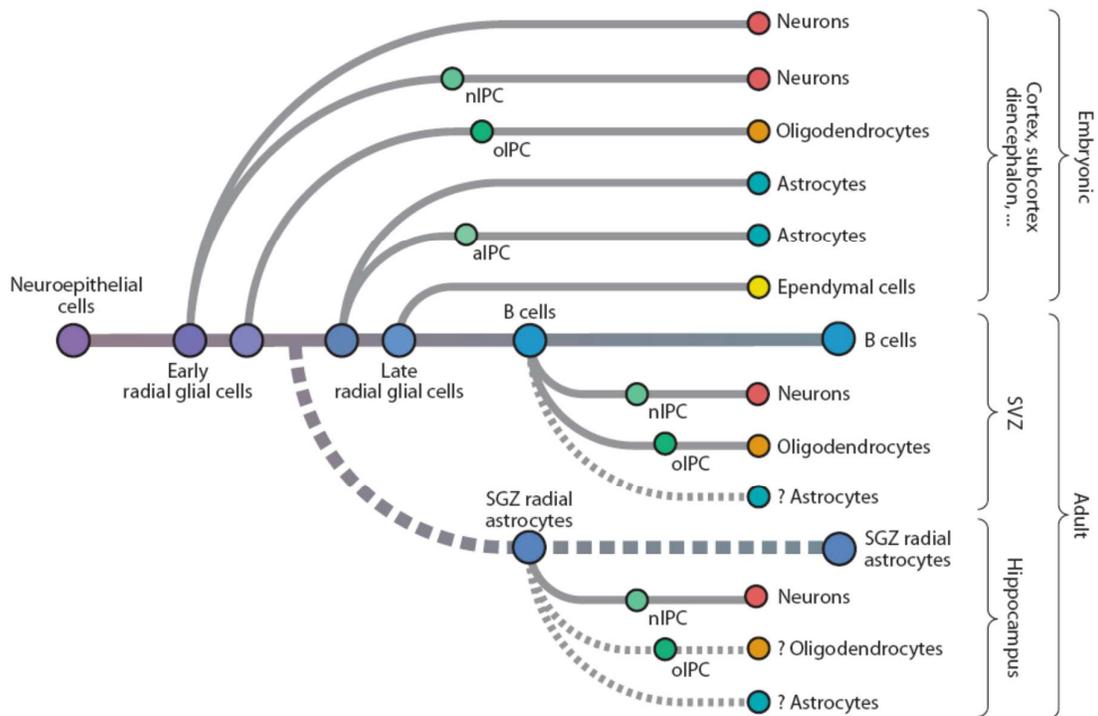


Figure 18 : Représentation de la lignée cellulaire des cellules souches neurales de l'embryogenèse à l'âge adulte (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009).

Les points violets à bleus représentent les cellules souches neurales aux différents stades de développement, des cellules neuroépithéliales aux cellules gliales radiales précoces et tardives, jusqu'aux cellules souches adultes (astrocytes germinatifs de la ZSV et la ZSG). Le lignage embryonnaire est représenté sur la moitié supérieure du schéma, alors que la moitié inférieure démontre le lignage postnatal et adulte. Les lignes en pointillés représentent des données hypothétiques. *nIPC* : Intermediate progenitor cells for neurons ; *oIPC* : Intermediate progenitor cells for astrocytes ; *NSC* : neural stem cells ; *RG* : radial glia ; *SGZ* : subgranular zone ; *SVZ* : subventricular zone.

A la fin de la période neurodéveloppementale embryonnaire, un grand nombre de cellules gliales radiales perdent leur adhérence ventriculaire et migrent à travers la plaque corticale. Chez les mammifères, la plupart de ces cellules se différencient en astrocytes corticaux (figures 18 et 19) (Noctor et al., 2008). Ce phénomène est retrouvé chez un grand nombre de mammifères : rongeurs, marsupiaux et primates (Morest, 1970; Choi and Lapham, 1978; Schmechel and Rakic, 1979). Des études ont aussi montré qu'un certain nombre de cellules gliales ne se différenciaient pas en astrocytes mature, perdaient leur caractéristiques de cellules gliales radiales, mais gardaient, en revanche, la même fonction : cellules progénitrices pour la formation de neurones et cellules gliales durant la période post-natale et adulte (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Les cellules souches adultes (astrocytes de type B ou germinatifs) feraient partie de la lignée cellulaire de la glie radiale, seraient plus « spécifiées » et donneraient naissance à des neurones spécifiques des bulbes olfactifs ou du gyrus denté de l'hippocampe (figure 18).

Neurogenèse adulte : continuum de la neurogenèse embryonnaire

Des cellules particulières ont été caractérisées ces dernières années dans le système nerveux central des mammifères. Dénommées « cellules souches neurales », elles présentent des propriétés singulières d'auto-renouvellement et de multipotence. En d'autres termes, elles ont la capacité de générer, par division asymétrique, dans des conditions précises de différenciation, les trois types cellulaires majeurs du système nerveux : les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes. Joseph Altman a été le premier, en utilisant des techniques assez sensibles (thymidine tritiée comme marqueur mitotique) à mettre en évidence des cellules en prolifération dans l'hippocampe (Altman and Das, 1965) et les bulbes olfactifs (Altman, 1969) du cerveau adulte de mammifères. Ces résultats ont ensuite été confirmés en combinant thymidine tritiée et microscopie électronique (Kaplan, 1981). Cependant, du fait du manque de marqueurs immunohistochimiques de neurones à cette époque, l'identification de nouveaux neurones n'était basée que sur la morphologie des cellules. Aussi, l'étude d'une apparente neurogenèse adulte n'a pu être approfondie qu'avec l'émergence de nouvelles techniques (BrdU et infection rétrovirale des cellules progénitrices) et également de marqueurs immunohistochimiques permettant la caractérisation et l'identification des cellules.

L'analyse de la neurogenèse adulte et de la nature des cellules souches neurales adultes (astrocytes germinatifs) a débuté surtout chez l'oiseau. Il avait été montré, dans un premier temps que les cellules « de la glie radiaire » qui subsistaient après la naissance se trouvaient le long des murs ventriculaires et projetaient un long prolongement qui traversait les différentes couches de neurones. Ce prolongement servait à guider les neurones en migration afin qu'ils rejoignent leur régions d'intégration. Les cellules gliales radiaires adultes, chez l'oiseau sont capables de se diviser et de présenter un cil primaire sur leur surface apicale (Alvarez-Buylla et al., 1998). Cette prolifération se produit dans des régions spécifiques et corrèlent parfaitement avec la production de neurones (Alvarez-Buylla et al., 1990). L'émergence de technique d'infection rétrovirale a permis de montrer que ces cellules gliales radiaires et les neurones néoformés provenaient de la même lignée cellulaire (Goldman et al., 1996). Ces cellules gliales radiaires adultes sont aussi retrouvées chez le poisson, les reptiles, les rongeurs et les mammifères (Stevenson and Yoon, 1981; Altman and Bayer, 1990; Kalman, 1998; Doetsch et al., 1999). Chez les mammifères, la neurogenèse adulte se limite à deux zones précises du cerveau : la zone sous ventriculaire (ZSV)/bulbe olfactif et la zone sous granulaire du gyrus denté de l'hippocampe. Il a été possible de cultiver, *in vitro*, les cellules souches neurales adultes astrocytaires de la ZSV et de leur faire produire des neurones, sous l'action de facteurs de croissance (Heins et al., 2002; Berninger et al., 2007). Il semble que les cellules souches neurales adultes de la ZSV

fassent partie intégrante de la lignée neuroépithéliale -glie radiaire- astrocytes (figure 19) (Alvarez-Buylla et al., 2001).

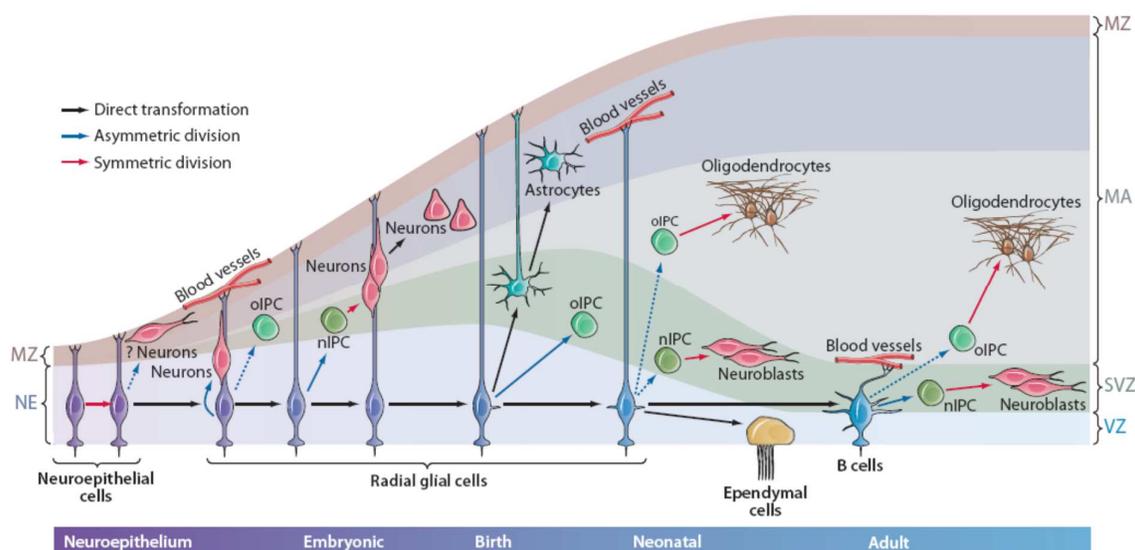


Figure 19 : Nature gliale des cellules souches neurales impliquées dans le neurodéveloppement embryonnaire et adulte (Kriegstein et Alvarez Bulla, 2009).

Durant le neurodéveloppement embryonnaire, les cellules neuroépithéliales se divisent symétriquement pour générer de nombreux clones. Certaines d'entre elles sont capables de générer des neurones. Elles s'allongent et se convertissent ensuite en cellules gliales radiaires (RG). Ces dernières cellules se divisent, elles, asymétriquement afin de générer des neurones, directement ou indirectement, par l'intermédiaire de cellules progénitrices proliférantes (nIPCs). Les oligodendrocytes dérivent aussi des cellules gliales radiaires, par l'intermédiaire de cellules progénitrices (oIPCs). Les cellules gliales radiaires sont polarisées : du côté apical, elles contactent le ventricule d'où elles émettent un cil primaire. Du côté basal, les cellules contactent les méninges, la lame basale ainsi que les vaisseaux sanguins. A la fin du développement embryonnaire, la plupart des cellules gliales radiaires se détachent du côté apical et se différencient en astrocytes. Une sous population de cellules gliales radiaires continue de générer des neurones et des oligodendrocytes par l'intermédiaire d'oIPCs et de nIPCs durant la période postnatale. Certaines se convertissent ensuite en cellules épendymaires alors que le reste se convertit en astrocytes de type B (astrocytes germinatifs) qui continueront de fonctionner comme des cellules souches neurales à l'âge adulte. Les astrocytes germinatifs maintiennent une organisation épithéliale en restant connectés au ventricule latéral du côté apical, et aux vaisseaux sanguins du côté basal. Ces cellules donneront naissance à des neurones et des oligodendrocytes par l'intermédiaire des oIPCs et de nIPCs. VZ : ventricular zone, NE : neuroepithelium, MZ : marginal zone, MA : mantle, SVZ : subventricular zone, RG : radial glial.

De nombreuses études ont suggéré que les astrocytes germinatifs (astrocytes de type B) de la ZSV et ZSG pouvaient être attribués à des cellules gliales radiaires et, de part leur morphologie et leurs caractéristiques histologiques, devaient être identifiées comme des astrocytes immatures, même si l'identité exacte de ces cellules reste encore controversée (Morshead et al., 1994; Johansson et al., 1999; Spassky et al., 2005). Le marquage sélectif de ces cellules gliales radiaires a permis de montrer le lien direct entre ces cellules et les astrocytes de type B de la ZSV. En effet, ces cellules peuvent être sélectivement marquées grâce à l'injection, dans leur prolongement, d'un adénovirus codant pour la recombinaison Cre. Une fois injectés, les adénovirus sont transportés de façon rétrograde dans le corps

cellulaire des cellules gliales radiaires, provoquant la recombinaison du gène reporteur dans cette sous population cellulaire. Ce marquage a permis de révéler que les cellules de type B (astrocytes germinatifs) de la ZSV, ayant un rôle de cellule souche neurale adulte dérivait de la glie radiaire (Merkle et al., 2004). Ces mêmes auteurs ont aussi démontré que la glie radiaire post-natale permettait la génération d'oligodendrocytes et d'interneurones dans le bulbe olfactif. Cependant, il n'a encore jamais été prouvé qu'un seul astrocyte de type B puisse donner à la fois des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes. La terminologie de multipotence donnée à ces cellules souches neurales adultes est abusive puisqu'il se pourrait qu'une cellule souche neurale ne puisse donner naissance qu'à un type neuronal bien distinct.

Dans la ZSV, les astrocytes germinatifs donnent naissance à des neuroblastes en migration au travers de la spécification neuronale des progéniteurs proliférant. Ces astrocytes, apparentés à la glie radiaire, expriment la GFAP mais pas la S100B, deux marqueurs astrocytaires ; elles représentent donc une population particulière à l'interface entre la glie radiaire et les astrocytes matures (figure 19) (Raponi et al., 2007). Comme les cellules gliales radiaires, les astrocytes germinatifs présentent un prolongement basal projetant radialement ou tangentiellement (selon leur localisation) sur les vaisseaux sanguins (figure 19) (Mirzadeh et al., 2008; Shen et al., 2008). Ils forment aussi des connections avec le mur ventriculaire. Ils présentent du côté apical, comme les cellules gliales radiaires, un cil primaire. Il est clairement démontré que les astrocytes de type B de la ZSV sont issus de la glie radiaire (Malatesta et al., 2000).

La caractérisation de l'origine gliale radiaire des cellules souches neurales adultes du gyrus denté de l'hippocampe fut plus complexe. Durant de nombreuses années, les études visaient à montrer qu'il n'y avait aucun lien entre cellules gliales radiaires et cellules souches neurales adultes hippocampales. Cependant, des études suggéraient que les cellules gliales radiaires du neuroépithélium du gyrus denté généraient différents types d'astrocytes, dont les astrocytes radiaires (futurs astrocytes germinatifs) (Eckenhoff and Rakic, 1984; Altman and Bayer, 1990). Très récemment, une étude par différents ciblage des cellules gliales radiaire a permis de mettre en évidence le lignage « indirect » des cellules souches neurales avec la glie radiaire. En effet, il semblerait qu'après la période post-natale, au moment où les cellules gliales radiaires commencent leur différenciation astrocytaire corticale, une sous population des ces cellules indifférenciées migrerait vers la « subpial zone », une région adjacente aux méninges et qui borde le gyrus denté en formation (le gyrus denté est formé et fonctionnel 5 semaines après la naissance) (Li et al., 2009). Ces cellules étendraient leur pied astrocytaire au niveau de la « future » couche moléculaire du gyrus denté, phénomène permettant le repliement des couches astrocytaires et neuronales indispensable à la

morphogenèse du gyrus denté (figures 18 et 20). Une fois le gyrus formé, les astrocytes germinatifs viendraient se nicher dans la ZSG adulte (Li et al., 2009).

Dans le gyrus denté de l'hippocampe, les astrocytes germinatifs de la ZSG expriment la nestine, et ont, à la fois des prolongements assez épais traversant la couche granulaire (CG) du gyrus denté, mais aussi des prolongements plus fins s'intercalant entre les neurones de la CG (Seri et al., 2001; Seri et al., 2004). Des études de microscopie électronique ont permis de montrer que ces astrocytes étendaient un « pied » basal formant une structure similaire à un panier qui borde les clusters de neuroblastes. Ces derniers formeront des neurites qui longeront le pied astrocytaire (Seri et al., 2004). Le cil primaire, organelle stratégiquement localisé à la surface apicale des astrocytes germinatifs de la ZSV et de la glie radiaire est aussi présent chez les astrocytes germinatifs de la ZSG (Breunig et al., 2008; Han et al., 2008). Dans le gyrus denté, le cil primaire est essentiel pour la prolifération des progéniteurs embryonnaires de la ZSG et la génération des astrocytes germinatifs de l'âge adulte (Breunig et al., 2008; Han et al., 2008).

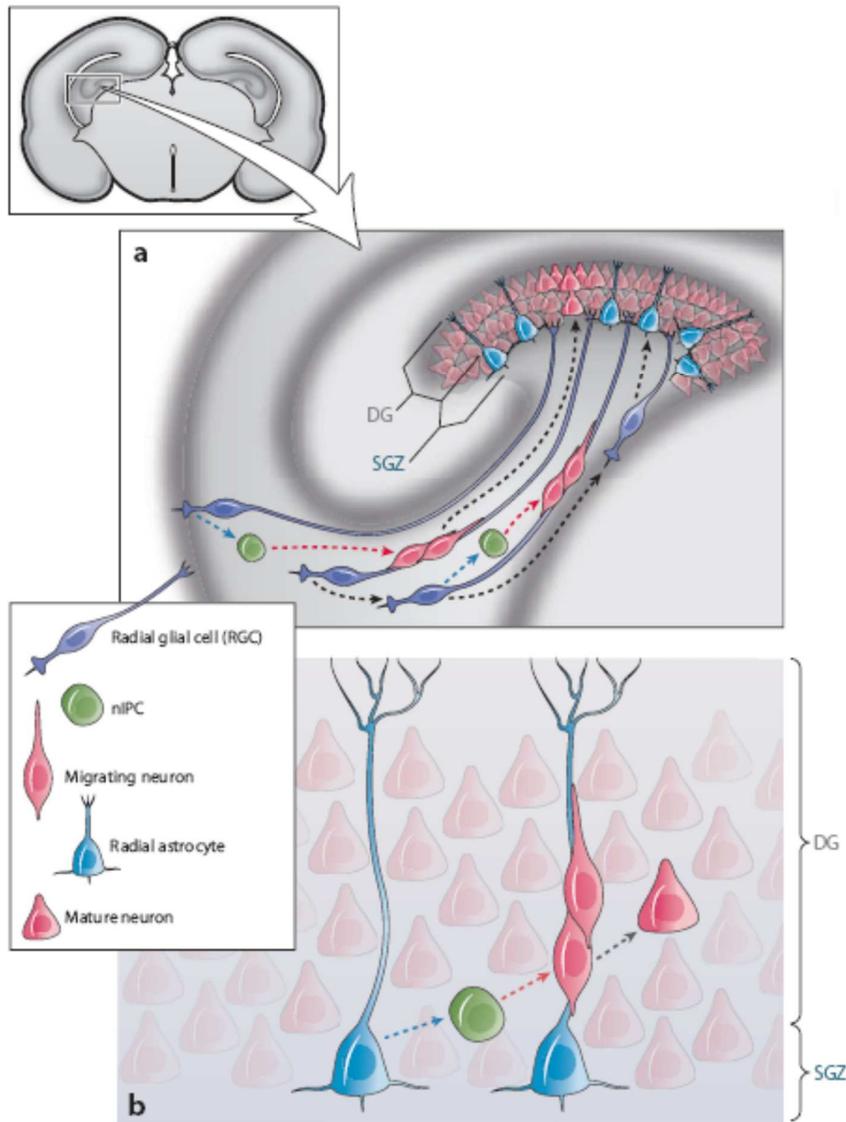


Figure 20 : Schéma représentatif des différents progéniteurs neuronaux et leur lignage dans le développement embryonnaire et adulte du gyrus denté de l'hippocampe (Kriegstein et Alvarez Bulla, 2009).

La ZSG est la seule région germinative à ne pas être attachée aux murs ventriculaires. **a** : devenir et organisation spatiale des cellules gliales radiaires (RG) du ventricule latéral (VZ) en cours de migration vers le gyrus denté en formation. Ces cellules gliales radiaires migrent vers le GD alors qu'elles continuent à produire des neurones par l'intermédiaire de progéniteurs proliférant (nIPCs). La glie radiaire génère des astrocytes radiaires germinatifs localisés dans la zone sous granulaire (SGZ). Ces dernières cellules présentent un pied proéminent (**a, b**) traversant la couche granulaire du gyrus denté et se connectant à la couche moléculaire. **b** : Les astrocytes germinatifs génèrent des progéniteurs proliférant (nIPCs) qui donneront ensuite des neuroblastes en migration qui se différencieront en neurones matures. Les jeunes neurones forment des contacts étroits avec le pied astrocytaire des astrocytes germinatifs avant de se différencier en neurones granulaires. Les flèches en pointillés indiquent l'hypothétique division symétrique (rouge) et asymétrique (bleue) des cellules gliales radiaires. Les flèches noires indiquent l'hypothétique transformation de la glie radiaire en astrocytes germinatifs de la ZSG. L'encart en haut à gauche montre une section coronale de cerveau de rongeur illustrant la localisation du gyrus denté en formation. SGZ : subgranular zone.

2.3.2 Neurogenèse adulte chez les mammifères

2.3.2.1 Notion de niche cellulaire germinative

Le processus de neurogenèse adulte (*NGA*) est l'exemple même d'une capacité régénérative imprévue du système nerveux central (*SNC*) adulte et soulève la question pertinente : Pourquoi la neurogenèse adulte se déroule et est-elle restreinte à un nombre infime de zones germinatives du *SNC* adulte ? Dans le cerveau de mammifère adulte, deux zones germinatives ont été décrites jusqu'à présent : la zone sous ventriculaire (*ZSV*) / système olfactif et la zone sous granulaire (*ZSG*) du gyrus denté (*GD*) de l'hippocampe (Gage, 2000; Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002). Le reste du cerveau demeure non germinatif, bien qu'il existe des zones où une neurogenèse réactive peut avoir lieu suite à un dommage cellulaire : cortex, CA1, striatum, hypothalamus (Gould et al., 2001; Dayer et al., 2005; Kokoeva et al., 2005; Luzzati et al., 2006). Le terme germinatif implique au moins deux conditions : premièrement, la présence de précurseurs immatures à partir desquels, des neurones peuvent se développer et, deuxièmement, l'existence d'un microenvironnement permissif à la neurogenèse (contacts cellulaires et facteurs extrinsèques permettant le développement neuronal). La dernière condition que doit remplir une zone germinative est sa permissivité d'un développement neuronal d'une cellule souche neurale transplantée (de ce point de vue, cette dernière, dans une zone non germinative, ne pourrait se spécifier qu'en cellule gliale ou alors mourir). Ces caractéristiques soulèvent alors une problématique complexe : Quels sont les parts d'influence du microenvironnement cellulaire et des propriétés des cellules souches neurales sur la *NGA* ? La permissivité neurogénique vient du fait que les cellules souches neurales (astrocytes germinatifs), présents dans les zones germinatives, sont maintenues dans un microenvironnement favorable formant alors une unité fonctionnelle appelée niche germinative. L'idée de la résidence des cellules multipotentes dans une région anatomique spécifique fut appréhendée à partir des études sur les transplantations de progéniteurs hématopoïétiques dans les années 70 (Schofield, 1978). Tous les organes présentant une régénération (peau, intestin, foie, moelle épinière) contiennent des niches germinatives (Li et al., 2005). Dans le cas de la *ZSV* et la *ZSG*, ces niches sont constituées d'astrocytes germinatifs, progéniteurs proliférant, neurones, cellules endothéliales, microglie ou macrophages et matrice extracellulaire en contacts étroits avec la membrane basale et ce de manière infime et spécifique (Lim et al., 2006). Ainsi les niches germinatives ont deux fonctions principales : la maintenance de l'activité germinative des astrocytes germinatifs et des progéniteurs proliférant, et la possibilité d'une différenciation neuronale de ces cellules.

2.3.2.2 Le système ZSV/Bulbe olfactif (BO)

La ZSV correspond à la région située entre le striatum et les ventricules. Les astrocytes germinatifs de la ZSV (appelées cellules de type B), résidant entre le parenchyme striatal et la couche de cellules épendymaires bordant les ventricules latéraux, et se divisant très lentement, vont générer des progéniteurs proliférant rapidement (cellules de type C) (figure 21) (Doetsch et al., 1999). Ces cellules, au fur et à mesure de leurs divisions, donneront naissance à des neuroblastes (ou progéniteurs neuronaux, DCX⁺) qui vont migrer en chaîne le long de la RMS (*Rostral Migratory Stream*), guidés par un tunnel d'astrocytes (Lois et al., 1996) et atteindre les bulbes olfactifs (figure 22B). A ce niveau, ces neuroblastes vont migrer radialement et tangentiellement afin de se différencier en interneurones granulaires ou périglomérulaires GABAergiques et dopaminergiques (Kishi, 1987; Kosaka et al., 1998; Brill et al., 2009). Les neurones granulaires formeront des synapses dendrito-dendritiques particulières avec les cellules mitrales et les neurones touffus du bulbe olfactif afin d'inhiber leur excitation. Ces interactions sont impliquées dans les processus d'apprentissage et de discrimination olfactive (Lledo et al., 2006). Les neurones périglomérulaires connecteront eux les cellules mitrales de façon axo-dendritique et les terminaisons des nerfs olfactifs convergeant dans les glomérules (Kosaka et al., 1985; Kosaka et al., 1998; Kosaka and Kosaka, 2005a; Kosaka and Kosaka, 2005b). Il faut savoir que la NGA olfactive permet le renouvellement complet des populations neuronales granulaires et périglomérulaires (Ninkovic et al., 2007).

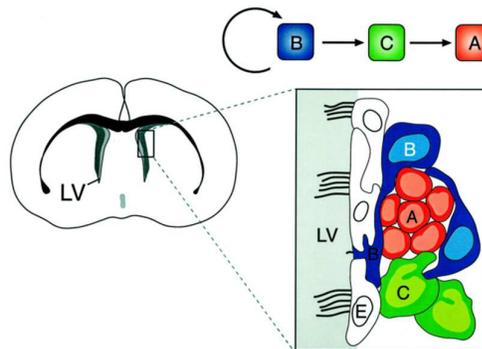


Figure 21 : Processus de neurogenèse adulte au sein de la zone sous ventriculaire (ZSV).

D'après Alvarez-Buylla *et al.*, 2002. Coupe transversale de cerveau adulte de souris (à gauche) et schéma de la composition et de l'architecture de la ZSV des ventricules latéraux (LV) durant les processus de neurogenèse chez l'adulte (à droite). Les astrocytes de la ZSV (cellules B, dérivant de la glie radiaire) se divisent pour donner des précurseurs (cellules C), lesquels vont rapidement générer des neuroblastes (cellules A). Ces derniers migrent ensuite jusqu'aux bulbes olfactifs. Les cellules notées E sont des cellules épendymaires.

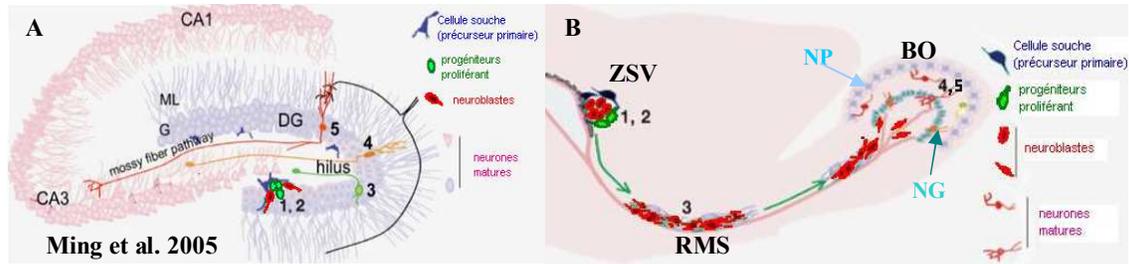


Figure 22 : Schémas représentatifs de la neurogenèse chez la souris adulte.

A : Représentation spatiale de l'hippocampe ; *DG* : gyrus denté, *G* : couche granulaire, *ML* : molecular layer (couche moléculaire) *CA* : Corne d'Ammon, « *mossy fiber pathway* » : fibres moussues. **B :** Représentation sagittale de la ZSV ; *ZSV* : zone sous-ventriculaire, *BO* : bulbe olfactif, *NP* : neurones périglomérulaires, *NG* : neurones granulaires. Pour A et B, *1* : prolifération (cytogénèse), *2* : spécification neuronale, *3* : migration, *4* : maturation morphologique, *5* : maturation fonctionnelle.

2.3.2.3 La zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe

Au niveau de l'hippocampe, les astrocytes germinatifs résident dans le premier tiers interne de la CG du GD et juste au dessus de l'hippocampe. Ces cellules génèrent, par division lente des progéniteurs proliférants qui donneront eux même des neuroblastes (type D), précurseurs neuronaux DCX^+ , qui vont migrer localement dans la CG afin de se différencier en neurones granulaires (figure 20) (Kuhn et al., 1996). A partir de la CG, ces neurones immatures vont étendre leur axones dans l'hippocampe, afin d'aller connecter les dendrites des neurones de la CA3 (figure 22A). Les faisceaux d'axones connectant la CA3 que forment les neurones granulaires sont appelés les fibres moussues (Stanfield and Trice, 1988; Markakis and Gage, 1999; Ming and Song, 2005). Durant leur maturation, ces neurones étirent leurs dendrites à travers la couche moléculaire afin de pouvoir connecter les neurones du cortex entorhinal. Ils reçoivent ainsi des signaux glutamatergiques du cortex entorhinal, GABAergiques des interneurones voisins et envoient des signaux glutamatergiques aux neurones de la CA3 (Toni et al., 2008).

Les progéniteurs proliférants expriment la nestine et Sox2, mais pas la GFAP (Encinas et al., 2006). Ces cellules sont mitotiquement très actives. Elles sont souvent retrouvées sous forme de « cluster » (petit groupe de cellules). Peu d'entre elles restent isolées, soit parce qu'elles n'ont pas encore entamé leur cycle de prolifération intense, soit parce que cette cellule isolée correspond en fait à un astrocyte germinatif (Kempermann et al., 2004b; Kempermann et al., 2004a).

Il existe différentes classes de neuroblastes (D1, D2 et D3) qui correspondent aux intermédiaires successifs de progéniteurs neuronaux aboutissant progressivement à l'obtention du neurone granulaire (figures 23 et 24) (Seri et al., 2001). Ces cellules présentent un corps cellulaire large et rond ou ovale parsemé de petites extensions

orientées tangentiellement, malgré leur état encore indifférencié. Ces neuroblastes présentent des propriétés électrophysiologiques clairement distinctes des astrocytes (Filippov et al., 2003). Elles n'expriment plus la nestine et Sox 2 alors que débute l'expression de PSA-NCAM (*PolySiliated Acid- Neural Cell Adhesion Molecule*), une molécule impliquée dans la migration cellulaire, prouvant que ces cellules se sont spécifiées et ont acquis un état neuronal plus différencié que les progéniteurs de type D1 (Seri et al., 2004). Les deux sous-classes de cellules D expriment aussi la DCX, protéine associée à la fois dans l'initiation de la différenciation neuronale et dans la migration (figure 24) (Francis et al., 1999; Encinas and Enikolopov, 2008) et Prox-1, un facteur précoce de transcription spécifique de la lignée neuronale granulaire (Kronenberg et al., 2003). Pendant leur maturation, les neurones granulaires exprimeront à la fois DCX et PSA-NCAM (figure 24).

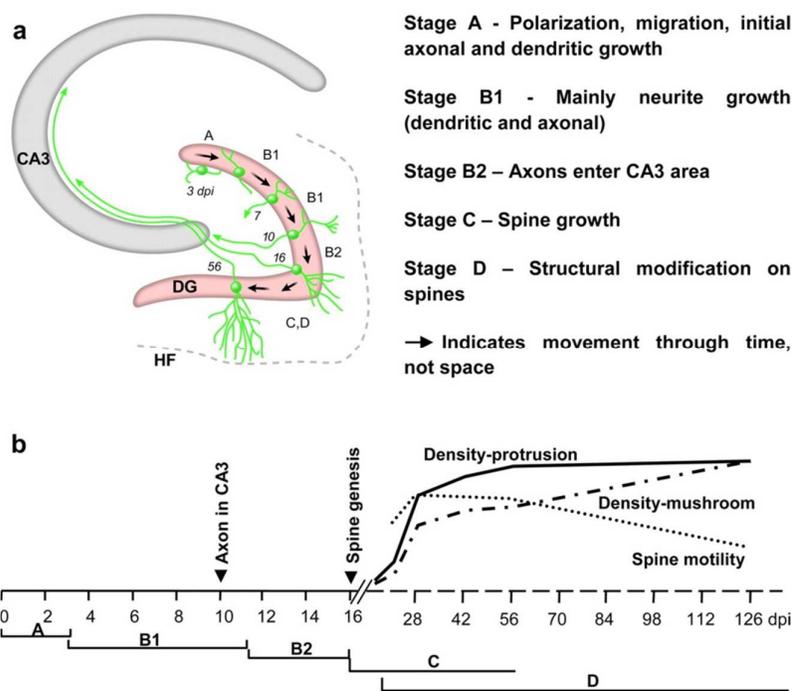


Figure 23 : Résumé des étapes de maturation neuronale dans le gyrus denté de l'hippocampe (d'après Zhao et al, 2006).

a, La maturation des neurones granulaires se déroule en 4 étapes. Le Stage A regroupe les étapes initiales de la maturation neuronale juste après la sortie des cellules D1 du cycle cellulaire : spécification neuronale, polarisation axonale, et le début de la croissance neuritique. Le Stage B regroupe les étapes de croissance axonale et dendritique des neuroblastes. Les cellules B1 et B2 correspondent aux neuroblastes de type D2 et D3. Un neuroblaste est qualifié de type B2 (D3) lorsque ses fibres axonales ont rejoint la CA3. L'initiation de la croissance des épines dendritiques caractérise le stage C. Durant ce stage se dérouleront les étapes tardives de la croissance dendritique et axonale (formation et maturation des boutons et épines dendritiques et synaptogenèse fonctionnelle). Le stage D débute dès la fin de la formation des épines dendritiques et se déroulera sur plusieurs mois. DG, Dentate gyrus ; HF, hippocampal fissure. **b**, schématisation temporelle des différents événements morphogénétiques ayant lieu au cours de la maturation des neurones granulaires néoformés. *Dpi* : Days post-injection.

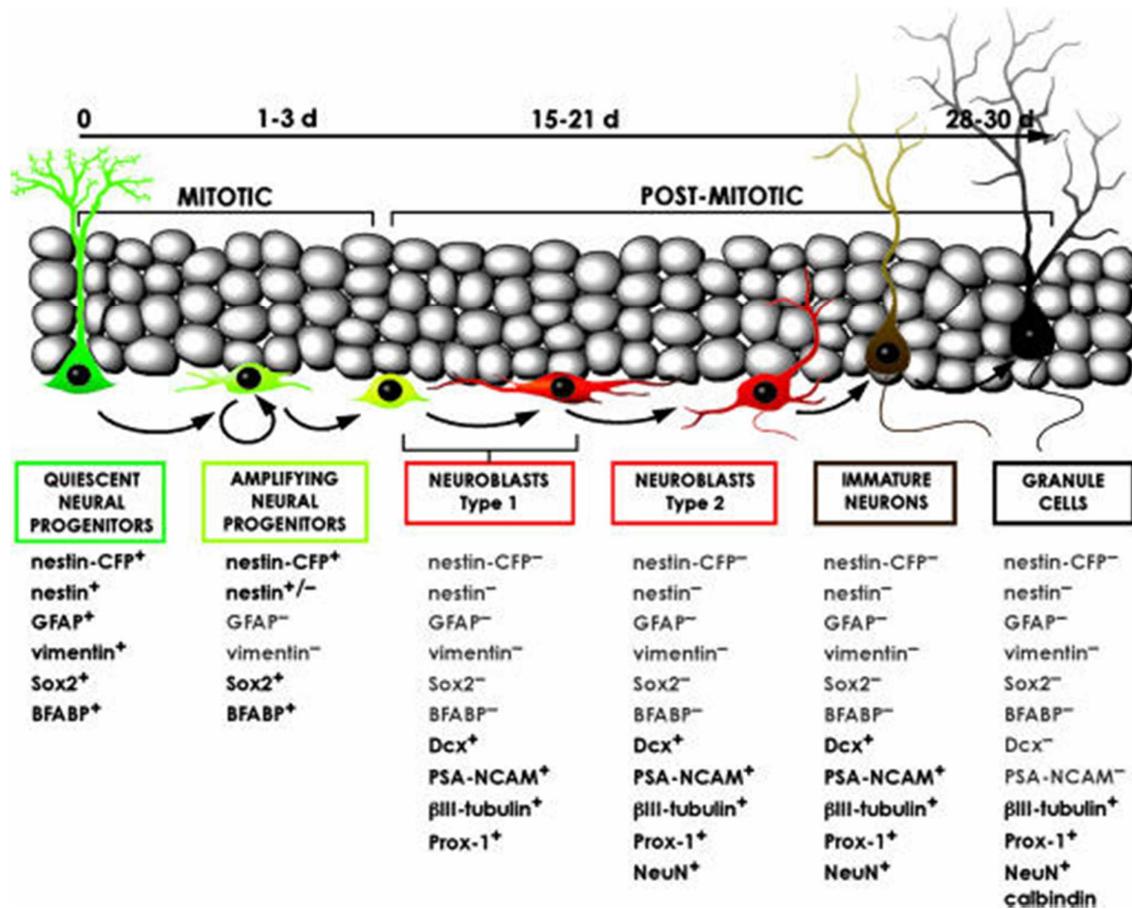


Figure 24 : Représentation schématique des différentes populations de cellules impliquées dans la neurogenèse adulte hippocampale (d'après Encinas et Enikolopov, 2008).

Représentation temporelle de l'apparition progressive des progéniteurs proliférants (*amplifying neural progenitors*), des neuroblastes de type D1 (*neuroblasts type 1*), de type D2 (*neuroblasts type 2*), de type D3/Neurones immatures (*immature neurons*) et des neurones en grain matures (*granule cells*). Ce schéma représente aussi les différentes morphologies des sous classes de neuroblastes.

Les cellules D2 présentent des courts et épais prolongements alors que les cellules D3 ont déjà acquis les caractéristiques morphologiques de neurones immatures incluant de nombreux prolongements radiaux proéminents et très branchés qui s'étendent à travers la couche moléculaire (futurs dendrites) et des prolongements fins et moindres projetant vers l'hilus (futur axone : fibres myélinisées) (figures 23 et 24). Ces observations suggèrent que les progéniteurs proliférants se divisent, donnent naissance à une cellule postmitotique D2 qui va mûrir par l'intermédiaire d'un stade D3 pour former, au final, un neurone granulaire fonctionnel (Seri et al., 2004). Il n'existe à aucun moment du processus une cellule présentant à la fois des marqueurs neuronaux et gliaux. Ce qui laisse penser que même si les progéniteurs neuronaux demeurent multipotents (gliaux et neuronaux), la nature du lignage est susceptible de se faire au niveau de la prolifération soit des astrocytes germinatifs

(cellules de type B), soit des progéniteurs proliférant. Cependant, l'expression de DCX reste étroitement liée au devenir neuronal et non glial (Shetty et al., 2004).

Grace aux techniques de reconstruction 3D, il est clairement défini que les clusters de cellules D nichent dans les «berceaux» que forment les astrocytes germinatifs, demeurant au contact très intime des neurones granulaires matures (figure 20) (Seri et al., 2004). Comme nous l'avons vu tout à l'heure, la différenciation postmitotique de ces cellules est caractérisée par l'expression transitoire de la DCX, la PSA-NCAM et l'apparition des marqueurs neuronaux NeuN, Calrétinine et Calbindine (Kempermann et al., 2004b). La majorité de la formation neuritique a lieu durant cette période (Brandt et al., 2003; Ambrogini et al., 2004). L'élongation de l'axone est rapide et commence juste après l'obtention du statut postmitotique des neuroblastes. Les connections neuronales granulaires/CA3 sont établies, mais non fonctionnelle dès 4 à 10 jours après l'apparition des neuroblastes (Gould et al., 1999). Pendant les premiers stades de maturation neuronale, les nouveaux neurones présentent une résistance accrue aux stimuli synaptiques et une forte résistance membranaire suggérant que leur maturation n'est pas régulée, du moins durant cette période, par l'activité neuronale environnante (Esposito et al., 2005; Ge et al., 2006). Ensuite, ils reçoivent des stimuli GABAergiques des interneurons de la CG, essentiels pour l'établissement des synapses fonctionnelles et le développement des dendrites, mais toujours pas de stimuli glutamatergiques (Sernagor et al., ; Ge et al., 2006; Overstreet-Wadiche et al., 2006; Overstreet-Wadiche and Westbrook, 2006). Au cours des deuxièmes et troisièmes semaines de maturation neuronale, les propriétés électrophysiologiques des neurones nouvellement générés sont établies mais non finies. La signalisation glutamatergique ne sera fonctionnelle qu'entre 14 et 18 jours de développement et progresse simultanément avec l'élongation dendritique et la formation des épines dendritiques (Zhao et al., 2006). A 7 semaines de maturation, les jeunes neurones sont maintenant capables d'envoyer des potentiels d'actions aux neurones de la CA3 via les fibres moussues et présentent des réponses électrophysiologiques similaires aux neurones granulaires voisins, prouvant qu'ils se sont bien intégrés dans les réseaux synaptiques préexistants (van Praag et al., 2002).

La seule manière de distinguer les neurones nouvellement générés des neurones granulaires formés durant l'embryogenèse est l'étude électrophysiologique de leur plasticité synaptique : en effet, leur seuil d'induction de la potentialisation à long terme (LTP) est nettement plus faible, elles sont donc plus potentialisables (Schmidt-Hieber et al., 2004). De récentes études ont d'ailleurs montré que la survie des neurones nouvellement générés dépendait de leur aptitude à exprimer les récepteurs au glutamate de type NMDA (spécifiquement la sous unité NR₁), suggérant que leur survie et leur capacité à intégrer les

réseaux synaptiques existants sont finement régulées par leurs caractéristiques électrophysiologiques (Tashiro et al., 2006).

Les astrocytes germinatifs de la ZSG produisent un large excès de cellules destinées au lignage neuronal et un surplus de neurones immatures. Celles qui ne seront pas recrutées fonctionnellement sont éliminées par apoptose (Biebl et al., 2000). La mort cellulaire des neuroblastes semble nettement supérieure à celle des cellules progénitrices. Il semblerait que tous les neuroblastes soient en fait destinés à mourir et que ce sont les processus fonctionnels acquis pendant leur maturation réussie qui leur permettraient de survivre (Kempermann et al., 2004b; Kempermann et al., 2004a). L'élimination des cellules incapables de réagir aux stimuli de maturation est rapide, précoce et le nombre de cellules nouvellement générées devient stable 3 semaines après leur sortie du cycle cellulaire (Kempermann et al., 2003).

La NGA adulte diminue dramatiquement avec l'âge autant chez les rongeurs que chez l'humain (Kempermann et al., 2004a; Manganas et al., 2007). Des études ont montré que cette diminution provenait d'une réduction de l'activité proliférative des progéniteurs proliférant et de migration des cellules de la ZSG à la CG (Heine et al., 2004; McDonald and Wojtowicz, 2005).

2.3.2.4 Régulation des différentes étapes de la NGA

La progression et la coordination du processus de NGA de la prolifération des CSN (Cellules Souches Neurales ou astrocytes germinatifs) jusqu'à l'intégration synaptique des neurones nouvellement générés font preuve de régulations intrinsèques et extrinsèques très pointues et complexes par une multitude de facteurs (figure 25). Nous allons présenter ces différentes régulations selon les deux types de phases du processus : les phases précoces de la NGA (prolifération des CSN et des progéniteurs, spécification neuronale et migration des neuroblastes) et les phases tardives (intégration synaptique, maturation morphologique et survies neuronales).

- **Régulations intrinsèques de la NGA**

Phases précoces de la NGA

Dans la ZSV, la spécification neuronale des astrocytes germinatifs est séquentiellement guidée par des facteurs de transcription bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) comme *Ascl1*, neurogénine 2, *Neuro-D1*, *Neuro-D2*, *Tbr1* et *Tbr2*, qui sont des protéines proneurales. Le pattern de bHLH exprimés au cours de la NGA hippocampale est à peu près équivalent à celui de la ZSV. L'action des bHLH suit un décours temporel débutant par une

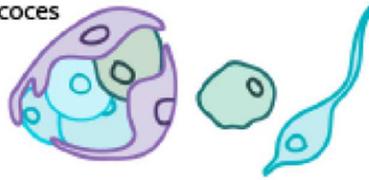
expression de protéines proneurales universelles (*Ascl1* et *Mash1*) jusqu'à arriver à l'expression de protéines spécifiques de sous types neuronaux (*Neuro-D1*) (Roybon et al., ; Roybon et al., 2009), induisant la différenciation neuronale et la sortie du cycle cellulaire par activation de protéines inhibitrices des kinases cyclines dépendant.

Les microARNs (*miARNs*) sont des ARN simple brin courts de 19 à 23 nucléotides, non codant régulant l'expression de certains gènes par appariement avec l'ARNm et inhibant ainsi la synthèse protéique. Ils exercent leur activité épigénétique en maintenant le statut *quo* de la cellule (par exemple l'identité tissulaire), ou régulant la progression d'un statut cellulaire

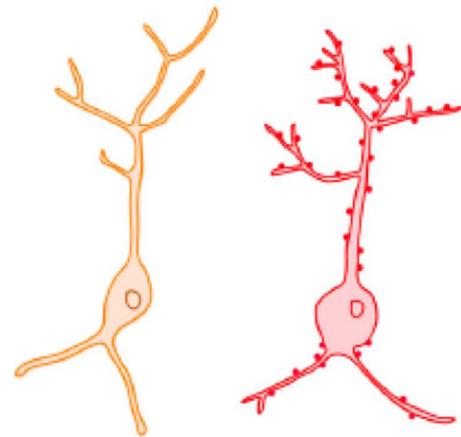
(par exemple pour le changement de statut d'expression de protéines lorsque la synapse silencieuse devient active) (Hornstein and Shomron, 2006; Schratt et al., 2006). Récemment, il a été montré que les miARNs seraient impliqués dans la spécification neuronale des progéniteurs proliférant de la ZSV (Cheng et al., 2009). Une hypothèse a émergé énonçant que ce seraient les miARNs qui réguleraient l'expression des bHLH transitoires dans les progéniteurs afin d'enclencher progressivement leur spécification neuronale. De plus, dans la ZSV, le miARNs 124 semble exprimé de façon importante durant la différenciation neuronale ; une surexpression de ce même miARN augmenterait le nombre de neurones matures alors que son extinction favoriserait la gliogenèse au détriment de la neurogenèse (Cheng et al., 2009). miARNs 124 est un antagoniste de *sox9*, un facteur de transcription impliqué dans la spécification gliale. Il interagit aussi avec SCP1, un composant du complexe REST/NRSF réprimant les gènes de spécification neuronaux dans les cellules immatures (Boutz et al., 2007; Makeyev et al., 2007; Visvanathan et al., 2007).

Au niveau du GD, l'action des facteurs de transcription bHLH sur la spécification neuronale a aussi été mise en évidence au cours de la NGA : *Ascl1* et neurogénine 2 (Kim et al., 2007; Jessberger et al., 2008). La déficience d'EF2 provoque aussi des diminutions de la prolifération des progéniteurs proliférant de la ZSG et de la production de neurones in fine, comme dans la ZSV (Cooper-Kuhn et al., 2002).

Phases précoces



Phases tardives



	Molécules	Prolifération	Spécification	Migration
ZSV	bHLH protein Ascl1, Neuro-D, neurogenins		+	
	Rb/E2F	+		
	Cdk inhibitors p27KIP1, p19INK4d	-		
	microRNA-124	-	+	
	FGF-2	+		
	EGF	+		
	VEGF	+		+
	IGF-1	+		
	Sonic Hedgehog	+		
	Notch	+		
	Noggin			+
	Smad4			+
	Slit-1/Slit-2			+
	Netrin/Neogenin/DCC			+
	Prokineticin2			-
Eph/ephrins	+			
α6β1 integrin			+	
Tenascin-R			+	
Reelin			+	
Dopamine	+			
GABA	-			
Glutamate	+/-			
ZSG	bHLH protein Ascl1, Neuro-D, neurogenins		+	
	Rb/E2F	+		
	DISC-1	+		
	FGF-2	+		
	VEGF			+
	IGF			+
	Neurotrophin-3			+
	Sonic Hedgehog	+		
	Wnts			+
	Notch	+		
	Neurogenesis-1			+
	Dopamine	+		
	GABA			+
	Glutamate	+/-		

Facteurs intrinsèques, Facteurs extrinsèques, Neurotransmetteurs

	Molécules	Phase 4	Phase 5	Phase 6
ZSV	CREB	+		+
	BDNF			+
	GABA	+		
	Glutamate		+	+
	CREB	+		+
	Cdk5	+	+	+
ZSG	Neuro-D1			+
	DISC-1	-	-	
	Kif-9	+	+	
	BDNF	+		+
	FGF-2		+	
	NT-3		+	
ZSV	Notch	+		
	GABA	+	+	
	Glutamate		+	+

Phase 4 : Développement dendritique
Phase 5 : Intégration synaptique
Phase 6 : Survie

Figure 25 : tableaux récapitulatifs des régulations intrinsèques et extrinsèques des phases précoces et tardives de la neurogenèse adulte (d'après Pathania et Borday, 2010).

(ZSG : Zone Sous Granulaire, ZSV : Zone Sous Ventriculaire)

En outre, de nombreuses études suggèrent un rôle majeur du gène de susceptibilité à la schizophrénie, DISC1 dans la régulation des phases précoces et tardive de la NGA hippocampale. Très récemment, des études visent à mettre en évidence le rôle de DISC1 dans la ZSG. Il semble que DISC1 soit impliqué dans la capacité proliférative des progéniteurs de la ZSG en inhibant GSK3β et ainsi, la β caténine (Duan et al., 2007; Mao et al., 2009). Il est probable qu'il ait aussi un rôle dans la migration des neuroblastes. Les

astrocytes germinatifs exhibent des pieds cytoplasmiques entrant en contact étroit avec les vaisseaux sanguins, leur permettant de répondre à la stimulation de facteurs présents dans le système sanguin (Filippov et al., 2003). Dans le cerveau en développement, avant que leurs synapses chimiques soient établies et fonctionnelles, astrocytes germinatifs communiquent avec leur environnement cellulaire via des jonctions gap constituées de connexine. Cette caractéristique est retrouvée au niveau des CSN de la ZSG adulte (Melanson-Drapeau et al., 2003).

Phases tardives de la NGA

Les stades tardifs de la NGA sont la survie, l'intégration synaptique et la maturation dendritique des neuroblastes. CREB (*cAMP response element binding*) est un facteur de transcription largement étudié connu pour réguler autant les processus tardifs de la plasticité synaptique et de la formation de la mémoire que la survie neuronale. Dans le BO adulte, CREB paraît important pour la survie neuronale et la mise en place de l'arborisation dendritique des neuroblastes (Giachino et al., 2005). La phosphorylation de CREB est transitoire et s'effectue lors de la migration des neuroblastes vers le BO et diminue lorsque les neurones migrent radialement dans le BO et s'intègrent synaptiquement. La souris déficiente pour CREB présente des déficits de survie des neuroblastes dans le BO. Par ailleurs, l'inhibition *in vitro* de CREB atténue de façon importante l'élongation neuritique suggérant que CREB modulerait positivement la survie et l'élaboration dendritique dans le BO.

Dans le GD, CREB a récemment été impliqué dans le développement dendritique et la survie neuronale (Jagasia et al., 2009). La dépolarisation GABA-dépendante est nécessaire à la phosphorylation de CREB dans le GD : l'inhibition de l'expression de NKCC (*Na/K Cl Canal*), un canal chlorique, abolit les dépolarisations GABA-dépendantes, provoquant une diminution importante de la phosphorylation de CREB et ainsi, une altération de l'extension neuritique et la survie neuronale dans le GD (Lagace et al., 2008; Jagasia et al., 2009). Cdk5 (*cyclin-dependant kinase 5*) semble aussi impliquée dans la modulation des phases tardive de la NGA hippocampale. En effet, l'ablation conditionnelle ou inductible de Cdk5 dans le GD postnatal provoque une réduction de la production de neuroblastes, sans modifier le nombre de progéniteurs proliférant, suggérant que Cdk5 est nécessaire à la maturation et la survie de neurones immatures (Lagace et al., 2008). Neuro-D1, un facteur de spécification neuronale, exprimé en aval de la neurogénine 2 durant les phases précoces de la NGA, a été récemment caractérisé comme régulant la survie des neurones nouvellement générés (Gao et al., 2009). Un autre acteur intracellulaire important pour le positionnement et la différenciation morphologique des neuroblastes du GD est DISC1. L'inhibition de

l'expression de DISC1 dans les astrocytes germinatifs démontre une accélération de l'intégration des neuroblastes découlant d'une altération de la formation dendritique et ainsi un positionnement aberrant du corps cellulaire neuronal à l'extérieur de la CG et la couche moléculaire du GD (Duan et al., 2007). Ces neurones néoformés présentent aussi une excitabilité de la membrane neuronale exacerbée et un surnombre de synapses malformées, suggérant que DISC1 régulerait les phases tardives de la NGA en freinant la formation dendritique et l'intégration synaptique des neurones nouvellement générés.

- **Régulations extrinsèques de la NGA**

- Phases précoces

Le rôle des facteurs neurotrophiques dans la régulation de la NGA a fait l'objet de nombreuses études (figure 25). Dans la ZSV, FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) semble influencer les étapes précoces de la neurogenèse, notamment la prolifération des progéniteurs et la migration des neuroblastes de la ZSV aux BO (Wagner et al., 1999). Par ailleurs, FGF2 est connu pour interagir avec le récepteur à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) exprimé par les progéniteurs proliférant dans lesquels l'exposition au FGF2 est nécessaire pour leur réponse à l'EGF et au TGF α (*Transforming Growth Factor α*), ligand endogène du récepteur à l'EGF (Kuhn et al., 1996; Lillien and Raphael, 2000; Jin et al., 2003). Des études ont montré que l'EGF augmenterait spécifiquement la prolifération des progéniteurs dans la ZSV au détriment du nombre de neuroblastes postmitotiques (Doetsch et al., 2002). Le VEGF (*Vascular, Endothelial Growth Factor*), une protéine angiogénique aux effets neurotrophiques et l'IGF1 (*Insulin-like Growth Factor1*) sont capables de potentialiser la prolifération et la production des neuroblastes dans la ZSV ainsi que le placement des neurones néoformés dans les BO (Jin et al., 2002; Hurtado-Chong et al., 2009).

A part réguler la prolifération des progéniteurs proliférant, les facteurs diffusibles semblent aussi avoir un effet sur l'initialisation de la mise en place des niches germinatives adultes, en influençant l'autorenouvellement des astrocytes germinatifs et la spécification neuronale. Ces facteurs impliqués dans ces processus ne font pas partie de la famille des facteurs diffusibles présent dans la circulation sanguine : sonic hedgehog (*Shh*), wnts, BMP (*Bone Morphogenic proteins*) et Notch/Delta. La signalisation Shh est nécessaire pour l'établissement et le maintien du pool d'astrocytes germinatifs quiescents de la SVZ (Balordi and Fishell, 2007). L'ablation de Smoothed, une protéine de la voie de signalisation Shh provoque l'interruption du processus de NGA dans la ZSV par la mort de tous les astrocytes germinatifs (Balordi and Fishell, 2007). La voie Notch/Delta est un système de communication cellule/cellule très conservé dans l'évolution. Elle est aussi impliquée dans le maintien de l'autorenouvellement et de l'inhibition de la différenciation neuronale des

astrocytes germinatifs (Chambers et al., 2001). BMP, une famille de facteurs de croissance identique aux TGF α , semblent impliqués dans le lignage glial des astrocytes germinatifs de la ZSV et noggin, un antagoniste de BMP, sécrété par les cellules épendymaires, joue le rôle de facteur de spécification neuronale (Lim et al., 2000).

Dans la ZSV, les neuroblastes ont à parcourir une distance allant jusqu'à plusieurs millimètres afin de se différencier et coloniser le BO. La migration des neuroblastes intègre deux phases : la phase de migration tangentielle de la ZSV à la jonction entre RMS et BO et une phase de migration radiale à la sortie de la RMS jusqu'au BO afin de commencer leur intégration synaptique dans la couche granulaire et périglomérulaire. L'expression de Slit-1 et Slit-2 dans la ZSV permet de maintenir les neuroblastes dans la ZSV puis dans la RMS. Simultanément, la production extracellulaire de netrine par les cellules mitrales du BO attire les neuroblastes dans le BO afin qu'ils puissent s'intégrer (Wu et al., 1999; Murase and Horwitz, 2002; Nguyen et al., 2003). La sécrétion de PK2 (*Protein prokineticin2*) permet aussi l'attraction des neuroblastes de la RMS au BO (Ng et al., 2005). La signalisation des ephrines est impliquée à la fois dans la régulation de la prolifération des progéniteurs, mais aussi dans la migration des neuroblastes (Holmberg et al., 2005).

Au niveau du GD, les effets des facteurs trophiques sur les phases précoces de la NGA sont très similaires à la ZSV. FGF-2 est aussi connu pour réguler positivement la prolifération des neuroblastes dans le GD (Zhao et al., 2007a). IGF-1 et VEGF augmentent la production de neurones (Aberg et al., 2000; Jin et al., 2002). La neurotrophine 3 (*NT3*), un facteur de croissance spécifique du GD semble nécessaire à la différenciation neuronale dans le GD (Shimazu et al., 2006). Comme pour la ZSV, la destruction totale de la signalisation shh aboutit à la perte du processus de génération de neurones à l'âge adulte et à l'atrophie de l'hippocampe (Han et al., 2008). L'ablation conditionnelle de Notch dans les cellules GFAP⁺ réduit considérablement la prolifération des progéniteurs en faveur d'une surproduction de neuroblastes DCX⁺ alors que l'expression constitutive de Notch a tendance à réprimer la spécification neuronale des progéniteurs en faveur de leur prolifération (Breunig et al., 2007). Il a été signalé que des antagonistes des BMP sont aussi retrouvés dans le GD adulte : neurogenesine 1, sécrétée par les astrocytes et les neurones granulaires environnants de la ZSG bloque la gliogenèse en faveur de la neurogenèse (Ueki et al., 2003).

Phases tardives

Les phases tardives de la NGA semblent aussi répondre aux signalisations induites par les facteurs neurotrophiques (figure 25). En effet, le polymorphisme d'un seul acide aminé du gène humain codant pour le BDNF (Val66Met) corrèle avec de nombreux troubles de

l'humeur et des déficits de mémorisation. Le BDNF semble aussi impliqué dans la survie des neuroblastes de la ZSV et la discrimination des odeurs (Bath et al., 2008). Cette étude a démontré aussi que le rôle du BDNF sur la survie neuronale passe par l'expression du son récepteur, TrkB par les neuroblastes de la ZSV.

La signalisation BDNF est aussi très importante pour la NGA hippocampale. En effet, la souris présentant la mutation Val66Met du BDNF humain présente une anxiété accrue, des troubles de la mémoire coïncidant avec des réductions de volume hippocampal (Chen et al., 2006). La délétion conditionnelle ou inductible du récepteur au BDNF, TrkB dans les astrocytes hippocampaux de souris provoque une diminution de la survie neuronale au niveau du GD ainsi qu'une altération dans leur pousse et embranchement dendritiques (Bergami et al., 2009). La délétion complète de TrkB induit aussi un comportement anxieux chez la souris, une altération des phases tardives de la LTP hippocampale, suggérant les rôles de la signalisation BDNF dans l'intégration et la plasticité synaptique des neurones nouvellement générés de l'hippocampe. FGF2 semble aussi important pour les phases tardives de NGA du BO. Spécifiquement, la délétion du récepteur au FGF1 induit de sérieux troubles de la LTP et des déficits dans les processus de consolidation de la mémoire (Zhao et al., 2007a). L'altération de NT-3 provoque aussi une diminution de LTP corrélée à des défauts d'apprentissage durant des tests comportementaux (Shimazu et al., 2006). L'ablation conditionnelle et inductible de la voie de signalisation Notch résulte en une aberration de la formation dendritique des neurones nouvellement générés du GD, alors que son expression constitutive a tendance à la complexifier (Breunig et al., 2007).

- ***Régulations par les neurotransmetteurs***

- *Le GABA*

Le GABA, neurotransmetteur inhibiteur majeur du système nerveux central, est bien connu pour réguler le développement des circuits neuronaux embryonnaires et adultes (Barker et al., 1998; Ben-Ari, 2002; Bordey, 2006). L'effet dépolarisant du GABA sur les neurones en formation dans le cerveau adulte et les progéniteurs proliférant semble jouer un rôle dans la prolifération, la migration et la morphogenèse neuritique (Marty and Llano, 2005). La NGA de la ZSV et ZSG récapitulent bien le rôle du GABA embryonnaire (Bordey, 2006; Ge et al., 2007). Dans la ZSV et la ZSG, les CSN et les neuroblastes expriment tous deux les récepteurs GABAA. Des données électrophysiologiques indiquent que les neuroblastes relâchent du GABA aussi bien de façon synaptique que non synaptique et ceci active l'expression des récepteurs au GABA des CSN (Wang et al, 2003b, Nguyen et al, 2003). De part l'expression de transporteurs au GABA, les SCN sont capables de réguler les taux de GABA environnants au sein de la niche germinative. Le GABA potentialise aussi la

migration des neuroblastes le long de la RMS (Bolteus and Bordey, 2004). Ces données suggèrent que le GABA serait un régulateur négatif des étapes précoces de la NGA de la ZSV.

La dépolarisation des neurones immatures induite par le GABA est cruciale pour la formation synaptique durant l'embryogenèse (Wang and Kriegstein, 2008). A l'âge adulte, après leur migration vers le BO, les neuroblastes migrent tangentiellement vers la couche granulaire tout en élaborant une structure dendritique complexe associée à l'établissement de synapses fonctionnelles (Belluzzi et al., 2003; Carleton et al., 2003). Le rôle de la signalisation du récepteur GABA_A est important pour l'initiation, l'élongation et la stabilisation de l'arborisation dendritique des neurones immatures. En effet, le flux de Calcium induit par la dépolarisation gabaergique permet la stabilisation des protusions dendritiques en cours de formation (Gascon et al., 2006). Au niveau du GD, le GABA extracellulaire dépolarise les jeunes neurones dès les premières semaines de formation et permet aussi la formation de l'arbre dendritique. Après cette période se produit une inversion totale du gradient chlorique et le GABA devient alors hyperpolarisant et arbore alors son rôle signalétique physiologique.

Le glutamate

Durant la neurogenèse embryonnaire, la signalisation glutamatergique influence la prolifération, la spécification et la migration des neurones en cours de formation (LoTurco et al., 1995; Haydar et al., 2000; Schlett, 2006). Au cours de la NGA, les neuroblastes de la ZSV expriment aussi des récepteurs AMPA fonctionnels que les récepteur mGluR5 et GLUK5, un récepteur au kainate (Platel et al., 2008a; Platel et al., 2008b). Ces trois types de récepteurs induisent une augmentation de calcium intracellulaire dans les neuroblastes de la ZSV. On ne sait toujours pas par contre, si l'expression de ces récepteurs influence la migration des neuroblastes le long de la RMS. Le relargage spontané de glutamate par les astrocytes environnants de la ZSV permet l'activation des récepteurs NMDA des neuroblastes en cours de maturation, ce qui provoque une accélération de leur migration le long de la RMS. L'ablation génétique de la sous unité NR₁ du récepteur NMDA induit une apoptose massive des neuroblastes suggérant un rôle protecteur de la signalisation glutamatergique sur la survie des neuroblastes de la ZSV (Platel et al., 2010). Une fois dans le BO, les neurones commencent à s'intégrer synaptiquement dans les circuits préexistants, génèrent des potentiels d'action et établissent d'abord des signaux GABAergiques puis des signaux glutamatergiques (Belluzzi et al., 2003). Il a été récemment montré que les neurones granulaires nouvellement produits étaient capables d'exprimer une LTP transitoire en réponse à la signalisation glutamatergique environnante. Cette LTP disparaît ensuite lorsque

les neurones ont complété leur maturation, montrant que les neurones immatures ont des propriétés spécifiques et différentes des neurones matures (Nissant et al., 2009).

Au niveau de l'hippocampe, l'induction de la LTP au niveau des fibres perforantes du cortex entorhinal vers les neurones granulaires du GD stimule la prolifération des progéniteurs proliférant (Bruehl-Jungerman et al., 2006; Chun et al., 2006). Le glutamate peut donc participer aux phases précoces de la NGA hippocampale, cependant la complexité de sa signalisation ne nous permet pas encore d'établir de rôles précis concernant la spécification neuronale et la migration des neuroblastes du GD adulte. Les neuroblastes expriment des récepteurs NMDA ainsi que les sous-unités NR₁ et NR₂ (Ambrogini et al., 2004; Overstreet Wadiche et al., 2005; Nacher et al., 2007). La délétion d'une seule copie du gène codant pour la sous unité NR₁ dans ces neuroblastes suffit à réduire leur survie (Tashiro et al., 2006). La stimulation glutamatergique des neurones néoformés et leur réponse sont déterminantes pour leur survie (Platel et al., 2007; Platel et al., 2008b; Platel et al.). Ces résultats suggèrent que la survie neuronale dépend intimement de leur pouvoir glutamatergique, ainsi les neurones exprimant la sous-unité fonctionnelle NR₁ survivent, ceux qui ne l'expriment pas étant éliminés. Entre la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine de maturation, survient une période où l'expression fonctionnelle de NR₂ est indispensable pour la survie de ces mêmes neurones. L'expression de la sous unité NR₂ induisant une diminution du seuil de potentialisation de la synapse, les neurones nouvellement générés sont donc plus sensibles à l'induction d'une LTP (seuil d'induction plus faible que les neurones matures) qui reste insensible au GABA (Ge et al., 2007). Cette particularité est très importante et pourrait participer aux processus de mémorisation, d'apprentissage et de plasticité neuronale massive présente dans l'hippocampe.

La sérotonine (5HT)

La sérotonine durant le développement est considéré comme facteur neurotrophique très important, agissant en synergie avec le BDNF (Neckameyer, 2010). Elle stimule très fortement la prolifération de la glie radiaire, mais aussi les étapes de maturation morphologiques des neurones (Neckameyer, 2010). L'hilus, le GD et la couche moléculaire, est innervé massivement par des fibres sérotoninergiques provenant du raphé dorsal et médian (Oleskevich et al., 1991). Des signaux sérotoninergiques provenant du raphé sont très importants pour la régulation de la NGA hippocampale. La déplétion de 5HT dans des rats femelle, par dénervation chimique diminue massivement la prolifération cellulaire, le nombre de neurones DCX⁺ et le nombre de neurones nouvellement générés dans l'hippocampe et les BO (Brezun and Daszuta, 1999; Jha et al., 2006). Le déficit de prolifération peut être diminué par la greffe de neurones 5HT dans l'hippocampe. Les

traitements par les antidépresseurs comme la fluoxétine, inhibant la recapture de la sérotonine augmentent la NGA hippocampale de rats (Huang and Herbert, 2006) et de souris (Wang et al., 2008).

Bien que le rôle de la 5HT sur la NGA soit bien établi, il existe cependant 15 types de récepteurs à la 5HT et il n'est pas encore possible d'établir quels sont les récepteurs impliqués dans la régulation de la NGA hippocampale. Des antagonistes des récepteurs 5HT_{1A} réduisent la prolifération des progéniteurs proliférant chez des rats (Radley and Jacobs, 2002), mais la souris KO 5HT_{1A} ne présente pas de réductions de prolifération cellulaire (Santarelli et al., 2003). La suractivation chimique des récepteurs 5HT_{1A} augmente les capacités prolifératives de la ZSG sans affecter la différenciation ni la production in fine de neurones. De façon intéressante, l'expression des récepteurs 5HT_{1A} est très faible et concerne les SCN et neurones matures (Patel and Zhou, 2005). Ceci suggère que l'effet des récepteurs 5HT sur la prolifération dans le GD via les 5HT_{1A} serait indirect. Bien que la signalisation 5HT_{1B} ne semble pas réguler la prolifération des progéniteurs de l'hippocampe, la suractivation de ces récepteurs atténue les déficits induits par la déplétion sérotoninergique (Banar et al., 2004). Les effets des autres récepteurs à la sérotonine sur la NGA hippocampale restent diffus. Ceci signifie que le rôle de la sérotonine est complexe et dépend non seulement du type de récepteur exprimé, mais aussi de l'état de l'organisme. De plus, la signalisation sérotoninergique induit l'expression de facteurs neurotrophiques et de croissance qui eux, pourraient affecter la NGA (Duman and Monteggia, 2006).

La dopamine

La ZSV est innervée par des fibres dopaminergiques provenant de la substance noire alors que la ZSG est innervée, elle, par des fibres dopaminergiques provenant de l'aire segmentale ventrale. La signalisation dopaminergique semble réguler la prolifération des progéniteurs proliférant via l'expression des récepteurs D₂ dans les deux régions (Hoglinger et al., 2004; Miller and Gauthier-Fisher, 2009). Dans les patients souffrant de maladie de Parkinson, la prolifération dans la ZSV est largement diminuée. Cet effet a été montré comme découlant de l'induction d'EGF et CNTF sécrétés massivement en réponse à l'activité dopaminergique (O'Keeffe et al., 2009). Il semble que l'activité dopaminergique régule la prolifération dans la ZSV, mais aussi la spécification neuronale (Winner et al., 2006). Cependant, les données concernant l'influence de la signalisation dopaminergique dans la ZSG demeurent encore contradictoires et peu analysées.

2.3.3 Rôle fonctionnel de la NGA hippocampale

Il est maintenant bien démontré que les neurones nouvellement générés dans l'hippocampe sont électrophysiologiquement fonctionnels et intégrés dans les circuits neuronaux. Cependant, le rôle de ces neurones dans la fonction hippocampale demeure encore obscur et a fait l'objet d'une recherche intense ces dernières années.

Une des stratégies afin d'appréhender le rôle de la NGA hippocampale a consisté en l'étude de l'influence de la mémorisation et de l'apprentissage sur la NGA même. Alors que les tests d'apprentissage hippocampe-indépendant n'ont aucun effet, il semble que l'apprentissage hippocampe-dépendant améliore la survie des neurones âgés d'une semaine, sans affecter la prolifération des progéniteurs (Gould et al., 1999). Cette influence peut persister jusqu'à 2 mois après l'entraînement (Leuner and Shors, 2004). Les animaux qui apprennent mieux le test de Morris ont aussi une survie neuronale plus importante que ceux qui apprennent mal (Sisti et al., 2007). Ceci suggère que c'est réellement l'apprentissage et non juste l'exposition aux tests qui augmente la survie des neurones nouvellement générés. De plus, l'exercice physique, qui améliore les performances aux tests d'apprentissage hippocampe-dépendant, a aussi des effets bénéfiques sur la NGA hippocampale (van Praag et al., 1999; Brown et al., 2003). Il semble donc y avoir une très forte corrélation entre la fonction hippocampale et la neurogenèse adulte lors des processus d'apprentissage et de l'entraînement cérébral.

Une des fonctions que pourraient avoir les neurones hippocampaux nouvellement générés pourrait provenir de leurs propriétés physiologiques particulières comme une plasticité spécifique leur permettant de répondre et d'intégrer plus rapidement les stimuli présents durant les processus de formation de la mémoire (Buel-Jungerman et al., 2007). Cette idée vient du fait que les neurones nouvellement générés ont des seuils d'induction de LTP moins élevés et expriment immédiatement des gènes impliqués dans la plasticité et la formation de la mémoire. De façon intéressante, la LTP, qui joue un rôle dans le processus de mémorisation, est connue aussi pour réguler la NGA hippocampale (voir paragraphe régulation de la NGA par le glutamate). L'induction d'une LTP des fibres perforantes augmente la prolifération cellulaire des progéniteurs dans le GD et la survie neuronale des neurones âgés de 2 semaines (Buel-Jungerman et al., 2006). Ainsi, la plasticité neuronale dépendante de l'activité hippocampique dans le gyrus denté durant l'apprentissage pourrait être à l'origine de l'augmentation de la NGA observée (Buel-Jungerman et al., 2007).

Afin de prouver le rôle de la NGA dans les processus de mémorisation hippocampe dépendant, les études ont consisté à altérer la NGA hippocampale dans des rongeurs et analyser leur capacité à réussir les tests comportementaux cognitifs. L'ablation de la NGA

est restée le moyen le plus fiable et probant pour l'étude de sa fonction. Une altération de la NGA hippocampale par injection de MAM (methylazoxymethanol : un agent méthylant l'ADN et bloquant alors l'avancée dans le cycle cellulaire des cellules) chez des rats provoque des défauts d'apprentissage durant des tests conditionnés hippocampe-dépendant. Par ailleurs, l'altération de la NGA ne perturbe en aucun cas les tests d'apprentissage ne requérant pas l'hippocampe. Quand ces mêmes rats retrouvent, 3 semaines après, une NGA hippocampale fonctionnelle, ils sont de nouveau capables de réussir les tests d'apprentissage dépendant de l'hippocampe (Shors et al., 2001). Ces résultats suggèrent que les neurones nouvellement générés âgés d'1 à 2 semaines sont fonctionnellement très importants pour ces apprentissages hippocampe-dépendant (Bruehl-Jungerman et al., 2007).

La seconde technique utilisée afin d'abolir la NGA hippocampale a été l'irradiation aux rayons X. Des études ont montré que ces rayons, directement focalisés sur l'hippocampe de rongeurs, diminuaient leurs performances dans des tests d'apprentissage hippocampe-dépendant tels que la reconnaissance des objets cachés ou bien la peur conditionnée contextuelle (Madsen et al., 2003; Saxe et al., 2006; Winocur et al., 2006; Warner-Schmidt et al., 2008). Les résultats concernant les aptitudes au test de la peur conditionnée contextuelle après disruption de la NGA hippocampale demeurent contradictoires (Saxe et al., 2007). Cependant, cette contradiction est due aux approches complètement différentes dans les moyens d'ablation de la NGA et les temps d'attente entre disruption et test comportementaux (Bruehl-Jungerman et al., 2007). Concernant la performance des rats irradiés dans le test de la piscine de Morris (apprentissage et mémoire spatiales conditionnés), les résultats montrent tous une atteinte de la rétention à long terme (2-4 semaines) mais aucune différence dans l'apprentissage à court terme, suggérant que la NGA hippocampale pourrait être impliquée dans les processus d'apprentissage visuel et de mémoire à long terme (Snyder et al., 2005). Cependant, dans d'autres tests de mémoire et apprentissage spatiales conditionnés, comme le test de Barnes ou le T maze, les rats dont la NGA hippocampale est affectée ne réussissent ni l'apprentissage, ni la mémorisation de ceux-ci. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans la piscine de Morris car les deux autres tests sont beaucoup plus anxiogènes (la plate forme de Barnes est surélevée et non protégée et le T maze a des cloisons transparentes et exposées, sources de stress pour les rongeurs) et il est reconnu maintenant que le stress modifie les capacités de mémorisation et d'apprentissage.

Une autre approche utilisée pour altérer la NGA hippocampale a consisté à générer, par modifications génétiques, des animaux n'ayant plus de CSN adultes. Trois modèles de souris ont été utilisés dans la littérature. La souris GFAP-TK (Garcia et al., 2004), où les astrocytes germinatifs exprimant la thymidine kinase sont sélectivement éliminés après l'injection de gencyclovir (Saxe et al., 2006; Saxe et al., 2007). Les souris Bax où les cellules

nestine positive (astrocytes germinatifs et progéniteurs proliférant), exprimant la protéine pro-apoptotique Bax, sont spécifiquement éliminées lorsque que les souris sont traitées par la doxycycline (Dupret et al., 2008). Ces deux souris n'ont donc plus du tout de NGA. Les performances dans le test de la peur conditionnée contextuelle de la souris GFAP-TK sont quasi nulles. Cependant, elle ne présente aucuns déficits dans les tests de mémoire visuelle. Fonctionnellement, la LTP du gyrus denté est altérée (stimulation des fibres perforantes : axones des neurones du cortex entorhinal qui connectent les dendrites des neurones granulaires du GD). Contrairement à la souris GFAP-TK, la souris Bax présente des altérations dans les tests de mémoire visuelle mais aucune dans le test de la peur conditionnée. Les résultats obtenus avec ces animaux transgéniques restent encore non concluants.

Les données concernant le rôle de la NGA hippocampale semblent s'étayer, mais il est nécessaire d'explorer encore ce domaine pour délimiter l'implication de la NGA dans les troubles cognitifs présents dans différentes pathologies cérébrales.

2.3.4 Statut de la NGA dans les neuropathologies

Alors que la NGA hippocampale est bien caractérisée chez l'humain, la NGA olfactive demeure encore controversée. De plus, le rôle du système olfactif chez l'homme est beaucoup moins sollicité que chez les rongeurs. Par ailleurs, la taille des bulbes olfactifs chez l'humain est largement sous représenté, par rapport aux rongeurs. Depuis que le rôle de la NGA hippocampale dans les psychopathologies est peu à peu investigué, de nombreuses études concernant l'impact des pathologies neurales sur les niches neuronales germinatives adultes sont effectuées. Dans les neuropathologies (dégénératives, psychiatriques, traumatiques) la prolifération des progéniteurs et la migration neuronale sont presque toujours altérées que ce soit dans la ZSV ou la ZSG de modèles animaux. Cependant, on ne sait toujours pas si cette altération est la cause ou la conséquence de la pathologie (Thompson et al., 2008).

2.3.4.1 Maladies neurodégénératives

Les résultats obtenus chez les patients humains atteints de maladie neurodégénératives restent encore controversés. Pour l'instant, il semble que la NGA hippocampale soit augmentée chez les patients atteints d'Alzheimer (MA) (Jin et al., 2004a; Jin et al., 2004b). Cependant, elle est diminuée dans de nombreux modèles animaux Alzheimer excepté celui exprimant la forme mutant du précurseur amyloïde humain (Feng et al., 2001; Wen et al., 2002; Jin et al., 2004b; Verret et al., 2007). La mémoire associative et l'olfaction sont par ailleurs précocement affectées dans la MA suggérant que l'altération de la

NGA de la ZSV et la ZSG pourraient contribuer au développement de la maladie. Cependant le lien entre MA et NGA reste encore mal défini. Dans la maladie d'Huntington, les résultats ne sont pas mieux caractérisés. La prolifération des progéniteurs de la ZSV humaine semble augmentée et son taux directement lié à la gravité de la maladie (Curtis et al., 2003). Parallèlement, cette même prolifération est aussi augmentée dans un modèle animal d'Huntington, la souris $R_{6/2}$. De plus il semble que la migration des neuroblastes de la RMS soit aberrante et dérive vers le striatum plutôt que les BO (Batista et al., 2006).

Les patients humains parkinsoniens, dans lesquels la transmission dopaminergique est altérée, présentent une diminution de la prolifération des progéniteurs à la fois de la ZSV et la ZSG (Hoglinger et al., 2004), ce qui corrèle bien avec le fait que la dopamine agit positivement sur la prolifération (Baker et al., 2004; Borta and Hoglinger, 2007). Dans le modèle animal parkinsonien, le rat 6-OHDA (6-hydroxydopamine), la réduction de la prolifération de la ZSV semble aussi diminuée et la migration des neuroblastes aberrante (Baker et al., 2004; Hoglinger et al., 2007). Cependant le rôle exact de la migration différentielle dans ce modèle n'a trouvé encore aucune explication.

2.3.4.2 Epilepsie

La relation entre NGA hippocampale et les nombreux remodelages hippocampaux observés dans l'épilepsie temporale (réorganisation des fibres moussues, dispersion et activité aberrante des neurones granulaires) humaine et animale ont été massivement analysés. La NGA hippocampale semble augmentée et la migration des neuroblastes détournée vers l'hilus dans un modèle animal traité à la pilocarpine, un agent promoteur d'épilepsie (Parent et al., 1997; Scharfman et al., 2000). Cependant, le blocage de la prolifération cellulaire par irradiation n'empêche pas le remodelage des fibres moussues, suggérant la non-contribution des neurones nouvellement générés dans l'altération de la mise en place des fibres moussues (Parent et al., 1999). La perte de la migration normale des neuroblastes de la CG provient d'une diminution de la rééline par les interneurones, jouant un rôle dans la migration neuronale dans le GD (Gong et al., 2007). Les jeunes neurones ayant migré dans l'hilus présentent une hyperexcitabilité et seraient ainsi responsables de la genèse et la propagation de la lésion. La pilocarpine provoque aussi, au niveau de la ZSV une augmentation de la prolifération mais aussi une migration des neuroblastes aberrante qui se dirigent vers le striatum, le ceps calleux, l'hippocampe et le cortex (Parent and Lowenstein, 2002; Parent et al., 2006). Ces progéniteurs donnent naissance à des astrocytes et des oligodendrocytes au lieu de donner des neurones (Parent et al., 2006). On retrouve les mêmes dérégulations chez les patients épileptiques humains (Gonzalez-Martinez et al., 2007).

2.3.4.3 Troubles psychiatriques

- **Dépression**

De nombreuses études portant sur le rôle de la NGA dans les pathologies avaient suggéré qu'une diminution de la production de neurones hippocampaux à l'âge adulte suffisait au développement de la dépression. Par ailleurs, l'efficacité des antidépresseurs passait inexorablement par l'augmentation de la NGA hippocampale (Duman et al., 2001). Plusieurs études sur le comportement humain ont montré que le stress altérait la NGA hippocampale (voir chapitre sur les régulations de la NGA). De plus, les mécanismes du stress sont connus pour amplifier le statut dépressif chez les patients vulnérables et la moitié des patients déjà dépressifs présentent une dérégulation du système hypothalamo-hypophysaire (Carroll et al., 1968; Gold and Chrousos, 2002). Enfin, de nombreux traitements antidépresseurs utilisés de façon chronique sont connus pour augmenter le taux de NGA hippocampale au même moment où les premiers effets bénéfiques comportementaux se font ressentir (Duman et al., 2001).

Il est maintenant bien établi que les patients dépressifs ont aussi des capacités d'apprentissage et de mémorisation hippocampo-dépendant altérées et accompagnées d'une diminution du volume hippocampal (Sheline et al., 1999; Bremner et al., 2000; Austin et al., 2001; Fossati et al., 2001). Cette atrophie hippocampale semble aussi directement liée à la gravité et la durée de la maladie (Sheline, 2003). Il semble que l'augmentation de l'apoptose neuronale et gliale, la diminution du neuropil et de la NGA hippocampale soient responsables de ces changements volumétriques (Sahay et al., 2007). D'autres données cliniques et précliniques suggèrent que cette réduction de volume serait accompagnée d'une altération du neuropil (dendritique) et d'une diminution de la population gliale sans nécessairement modifier la prolifération des progéniteurs ou l'apoptose neuronale (Muller et al., 2001; Santarelli et al., 2003; Reif et al., 2006; Czeh and Lucassen, 2007).

La NGA hippocampale ne semble pas impliquée dans la mise en place de la dépression mais plutôt dans l'action bénéfique des antidépresseurs (Sahay and Hen, 2007). En effet, les délais d'efficacité des traitements (plusieurs semaines) correspondent directement au temps nécessaire à la maturation des neurones nouvellement générés. Quelque soit la nature des traitements (Inhibiteurs de la recapture des monoamines, tricycliques, chocs électroconvulsifs, inhibiteurs de phosphodiesterase), ils provoquent tous chez les rongeurs une augmentation de la NGA hippocampale (Madsen et al., 2000; Malberg et al., 2000; Manev et al., 2001; Nakagawa et al., 2002). D'autres traitements ayant des effets bénéfiques sur la dépression comme l'activité physique ou l'environnement enrichi renforcent aussi la production de neurones hippocampaux à l'âge adulte (van Praag et al.,

1999; Malberg et al., 2000; Meshi et al., 2006). La fluoxétine, par exemple, accélère la maturation des neurones granulaires immatures (Wang et al., 2008). La capacité des antidépresseurs à augmenter la survie neuronale reste encore controversée malgré le nombre élevé d'études s'y étant intéressées. Cependant, l'efficacité des antidépresseurs à contrer la diminution de NGA provoquée par le stress elle, est bien définie (Czeh et al., 2001; Malberg and Duman, 2003; Dranovsky and Hen, 2006). Finalement, l'ablation de la NGA dans des souris, quelque soit son mode (génétique, chimique...) ne provoque pas de comportement dépressif, mais empêche l'amélioration de la réponse aux tests comportementaux qui, normalement sont sensibles aux traitements antidépresseurs (Santarelli et al., 2003).

On ne sait toujours pas par contre, quelles sont les molécules et les mécanismes moléculaires régulant la NGA qui sont ciblés par les antidépresseurs. Sachant que les antidépresseurs agissent principalement sur le système sérotoninergique, de nombreuses études se sont portées sur les modèles animaux dont le système sérotoninergique a été altéré. Il semble que le récepteur 5-HT_{1A} soit essentiel pour l'efficacité de la fluoxétine, et non l'imipramine, sur l'augmentation de la NGA hippocampale (Santarelli et al., 2003). Le rôle des autres récepteurs sérotoninergiques sur la NGA reste encore mal défini. Nous savons par ailleurs que l'utilisation chronique d'antidépresseurs provoque la surexpression de facteurs de croissance et de survie neuronale comme le BDNF, FGF-2, VEGF et IGF-1 (Duman and Monteggia, 2006). Par ailleurs, l'augmentation de la survie des neurones nouvellement générés (et non la prolifération des progéniteurs) induite par les antidépresseurs tricycliques est abolie dans les souris BDNF^{+/-} et les souris transgéniques dominante négatives TrkB (Sairanen et al., 2005). L'administration d'antagonistes de la signalisation VEGF bloque aussi l'effet sur la NGA hippocampale de la fluoxétine, des chocs électroconvulsifs et la désipramine (Warner-Schmidt and Duman, 2007).

Il reste à déterminer les conséquences fonctionnelles de l'augmentation du nombre de neurones néoformés, via les antidépresseurs, sur les circuits neuronaux de l'hippocampe. Il semblerait que l'administration chronique de fluoxétine augmentant la LTP dans le gyrus denté et qu'elle dépende de la NGA. En effet, la fluoxétine n'agit plus sur la LTP dans les modèles chimiques d'animaux ne présentant plus de NGA hippocampale (Wang et al., 2008). Les études aujourd'hui tentent de définir les effets de la potentialisation de la fonction du GD, antidépresseurs-dépendante, sur l'activité hippocampale nécessaire à l'atténuation des troubles dépressifs (Sahay and Hen, 2007). Il reste donc à caractériser les effets de la NGA sur les comportements affectifs nécessaires à l'efficacité du traitement de la dépression.

- **Schizophrénie**

Il a été récemment montré que la prolifération des astrocytes germinatifs et des progéniteurs proliférant hippocampaux Ki-67⁺ (marqueur de cellules prolifératives) était diminuée dans des cerveaux post-mortem de patients humains schizophrènes, et que cette diminution pouvait contribuer à la mise en place de la maladie (Reif et al., 2006). Les études génétiques ont identifié plusieurs gènes associés à la schizophrénie comme DISC1 (Millar et al., 2000). DISC1 est exprimé principalement dans le cerveau embryonnaire (Austin et al., 2004) et joue un rôle dans le développement neuronal (Millar et al., 2003). La souris dont l'inhibition de DISC1 est restreinte aux neurones hippocampaux néoformés, présente une hypertrophie de ces nouveaux neurones, une accélération de la maturation dendritique aboutissant au final à une formation dendritique aberrante accompagnée d'une migration exacerbée au-delà de la couche moléculaire du GD. Les synapses présentent une maturation précoce qui les rend hyperexcitables (Duan et al., 2007). Ces résultats suggèrent que DISC1 orchestrerait la cinétique de l'intégration fonctionnelle neuronale au niveau du cerveau adulte et démontre le rôle essentiel des gènes de susceptibilité à la schizophrénie dans les processus de développement cérébral, incluant la NGA.

Un autre gène susceptible d'être associé à la schizophrénie est NPAS3. Une dysfonction de ce gène a récemment été retrouvée dans une famille humaine atteinte de schizophrénie (Kamnasaran et al., 2003). Elle découle d'une translocation entre les chromosomes 9 et 14 provoquant la troncation du gène NPAS3 entre l'exon 2 et 3. La protéine garde son domaine bHLH intact mais les domaines PAS eux sont tronqués. De plus, la souris KO NPAS3 présente une altération de la prolifération cellulaire hippocampale associée à une diminution de l'expression du récepteur FGF-1 (Pieper et al., 2005). Par ailleurs, une réduction de l'expression de la réeline est retrouvée chez la souris déficiente en FGF-1 (Erbel-Sieler et al., 2004). La réeline, protéine ubiquitaire et fortement exprimée dans l'hippocampe se trouve sous-exprimée dans des cerveaux post-mortem de patients schizophrènes (Impagnatiello et al., 1998). De façon intéressante, les souris KO réeline présente de fortes réductions de NGA hippocampale en faveur d'une gliogenèse plus importante (Zhao et al., 2007b).

Des études se sont intéressées à l'action des antipsychotiques sur la NGA hippocampale. Les antipsychotiques sont divisés en deux classes : les typiques et les atypiques, basés sur leur prédisposition à produire des effets secondaires sur les régions extrapyramidales (De Oliveira and Juruena, 2006). Le traitement chronique de souris par l'antipsychotique typique halopéridol n'a pas d'effet sur leur NGA hippocampale (Madsen et al., 2000; Malberg et al., 2000; Manev et al., 2001; Nakagawa et al., 2002) alors que le traitement aigu lui, amplifie la prolifération de la NGA hippocampale dans les gerbilles

(Dawirs et al., 1998). Cependant les traitements atypiques eux ont des effets significatifs sur la NGA hippocampale. L'olanzapine en médication chronique augmente la NGA alors que la clozapine augmente la prolifération cellulaire sans affecter la survie neuronale (Halim et al., 2004; Kodama et al., 2004). Il a été montré aussi que l'injection chronique de clozapine, mais non l'halopéridol, pouvait contrer l'effet de la phencyclidine (inhibiteur des récepteurs NMDA) diminuant, sans antipsychotiques, la prolifération de la NGA hippocampale (Maeda et al., 2007). Cependant, les effets des antipsychotiques atypiques demeurent controversés (Wakade et al., 2002; Smith et al., 2004; Wang et al., 2004). Il semble que l'effet des antipsychotiques diffère selon l'état de santé psychologique des animaux : les antipsychotiques ne semblent pas avoir d'effet sur les animaux sains alors qu'ils agissent sur la NGA de modèles murins de dépression ou de troubles apparentés à la schizophrénie.

Ces données suggèrent que les altérations de la NGA hippocampale pourraient être impliquées dans la pathogenèse de la schizophrénie, notamment dans les troubles cognitifs et les symptômes négatifs en relation avec des défauts de capacités fonctionnelles de l'hippocampe. Il se pourrait que l'efficacité des traitements antipsychotiques atypiques passe, en partie, par l'atténuation des déficits de la NGA (Reif et al., 2006). Finalement, les traitements les plus efficaces sur la NGA semblent pouvoir mieux atténuer les déficits cognitifs associés à la schizophrénie (Reif et al., 2006).

3 Matériels et Méthodes

3.1 Animaux

Lors de nos travaux, deux génotypes de souris ont été utilisés :

- Les souris KO STOP ($S^{-/-}$)
- Les souris sauvages ($S^{+/+}$)

La souche de souris $S^{-/-}$, développée au laboratoire, a été obtenue en remplaçant l'exon 1 du gène *stop* avec une cassette contenant un gène rapporteur (β -galactosidase) par recombinaison homologe (Andrieux et al, 2002). Chez les souris $S^{+/-}$ et $S^{-/-}$, l'expression de la β -galactosidase est donc sous le contrôle du promoteur de la protéine STOP et permet une étude fine du patron d'expression de la protéine STOP dans l'encéphale. Nous avons eu accès à deux séries d'animaux différant par leur fond génétique, obtenus à partir de différents protocoles de croisements décrits tableau 1 ci-dessous :

- Fond 1 : hybride 129SvPas/BalB - expérimentations sur animaux F2
- Fond 2 : hybride 129SvPas/C57 - expérimentations sur animaux F1

Fond 1 : hybride 129SvPas/BalBc		
FO	Souris $S^{+/-}$ Fond pur 129 S2/SvPas x Souris $S^{+/+}$ Fond pur BALB/cJ	
F1	Croisement : ♂ $S^{+/-}$ fond pur 129 S2/SvPas x ♀ $S^{+/+}$ BALB/cJ	\Rightarrow Souris $S^{+/-}$ 50% 129 S2/SvPas- 50% BALB/cJ
F2	Croisement : ♂ F1 x ♀ F1	\Rightarrow Souris $S^{-/-}$ X% 129 S2/SvPas- X% BALB/cJ
Fond 2 : hybride 129SvPas/C57		
F0	Souris $S^{+/-}$ Fond pur 129 S2/SvPas x Souris $S^{+/+}$ Fond pur C57BL/6	
F1	Croisement : ♂ FO $S^{+/-}$ 129 S2/SvPas x ♀ FO $S^{+/+}$ C57BL/6	\Rightarrow Souris $S^{-/-}$ 50% S2/SvPas- 50% C57BL/6

Tableau 1: Génération des souris invalidées pour le gene STOP selon les fonds génétiques utilisés.

3.2 Anticorps

3.2.1 Anticorps primaires

Nom	Protéine/Epitope	Espèce	Dilution	Origine
Anti-BrdU	BrdU : marqueur nucléaire de cellule en prolifération	Rat	1/75 ^{ème} IH 1/600 ^{ème} IF	<i>Abcys</i>
Anti-GFAP	Marqueur astrocytaire	Souris	1/1000 ^{ème} IF 1/1000 ^{ème} WB	<i>Upstate</i>
		Rat	1/500 ^{ème} IF	<i>TransLab</i>

Anti-DCX	Marqueur des neuroblastes et neurones immatures	Cochon d'inde	1/1000 ^{ème} IF 1/15000 ^{ème} IH	<i>Chemicon</i>
Anti-NeuN	Protéine nucléaire neuronale	Souris	1/4000 ^{ème} IF 1/10000 ^{ème} WB 1/40000 ^{ème} IH	<i>Chemicon</i>
Anti- β -galactosidase (β -gal)	Gène rapporteur traduisant l'expression de STOP chez les souris S ^{+/-} et S ^{-/-}	Lapin	1/1000 ^{ème} IF	<i>Rockfeller</i>
Anti-MAP1	Protéine dendritique associée aux MT	Souris	1/500 ^{ème} WB	<i>Sigma</i>
Anti-MAP2	Protéine associée aux MT retrouvée dans les dendrites et les corps cellulaires neuronaux	Souris	1/500 ^{ème} WB	<i>Sigma</i>
Anti-Tau1	Protéine axonale associée aux MT	Lapin	1/1000 ^{ème} WB	<i>Chemicon</i>
Anti-CaMKII	aa 448 à 460 de l'extrémité C-terminale de la kinase CaMKII	Souris	1/2500 ^{ème} WB	<i>BD Transduction Laboratories</i>
Anti-Ankyrine G	Protéine spécifique des segments initiaux des axones	Souris	1/400 ^{ème} WB	<i>Chemicon</i>
Anti-NF200	NF de 200 kD : axonal	Souris	1/1000 ^{ème} WB 1/1000 ^{ème} IF	<i>Chemicon</i>
Anti-NF150	NF de 150 kD : axonal	Souris	1/1000 ^{ème} WB	<i>Chemicon</i>
Anti-NF200 Ph	NF de 200 kD phosphorylé : axonal	Souris	1/2500 ^{ème} WB	<i>Chemicon</i>
Anti-Bassoon	Protéine impliquée dans l'architecture des boutons présynaptiques	Souris	1/1000 ^{ème} WB	<i>Chemicon</i>
Anti-Synapsine	Synapsine I	Lapin	1/100 ^{ème} WB	<i>Laboratoire Baudier</i>
Anti-GFP	<i>Aequorea victoria</i> GFP	Lapin	1/2000 ^{ème} IF	<i>MolecularProbes</i>
Anti-GAP 43	Protéine axonale	Lapin	1/500 ^{ème} WB	<i>Laboratoire Baudier</i>
Anti-NR1	Sous unité 1 du récepteur NMDA	Lapin	1/1000 ^{ème} WB	<i>Chemicon</i>
Anti-GluR1	Sous unité 1 du récepteur AMPA	Lapin	1/500 ^{ème} WB	<i>Chemicon</i>
Anti-PSD95	Post Synaptique Protein : protéine post synaptique retrouvée dans les rafts dendritiques et les épines	Souris	1/4000 ^{ème} WB	<i>Chemicon</i>
Anti-Synaptophysine	Protéine vésiculaire présynaptique	Souris	1/1500 ^{ème} WB	<i>Chemicon</i>
Anti-Lamine B	Protéine nucléaire ubiquitaire	Lapin	1/1000 ^{ème} WB	<i>Don</i>
Anti-Lamine A et C	Protéines nucléaires ubiquitaires	Lapin	1/1000 ^{ème} WB	<i>Don</i>
Anti-Histone H2b	Protéine nucléaire ubiquitaire	Lapin	1/500 ^{ème} WB	<i>Millipore</i>
Anti α tubuline \square 3A1	Tubuline alpha	souris	1/5000 ^{ème} WB	<i>Laboratoire</i>
Anti β tubuline	Tubuline bêta	souris	1/500 ^{ème} WB	<i>Laboratoire</i>
Anti-PLP	Protéine myélinique	Lapin	1/1000 ^{ème} WB	<i>Fabriqué au laboratoire</i>
Anti-MBP	Protéine myélinique	Rat	1/1500 ^{ème} WB	<i>Laboratoire</i>
Anti-CNPase	Protéine myélinique	Lapin	1/500 ^{ème} WB	<i>Sigma</i>
Anti-NG2	Marqueur des précurseurs d'oligodendrocytes	Lapin	1/500 ^{ème} WB	<i>Laboratoire</i>
Anti- β III tubuline	Isoforme de bêta tubuline spécifique des neurones	Souris	1/100 ^{ème} WB	<i>Sigma</i>
Anti-NSE	Gamma émolase neurone spécifique	Poulet	1/1000 ^{ème} WB	<i>Chemicon</i>

Tableau 2 : Anticorps primaires utilisés.

IF : immunofluorescence ; WB : Western-blot ; IH : immunohistochimie.

3.2.2 Anticorps secondaires

Nom	Couplage	Espèce	Dilution	Origine
Anti-IgG de souris	Alexa 488	chèvre	1/1000 ^{ème} IF	<i>Jakson</i>
Anti-IgG de lapin	Cyanine 3		1/1000 ^{ème} IF	<i>Molecular Probes</i>
Anti-IgG de rat	Cyanine 5		1/500 ^{ème} IF	<i>Molecular Probes</i>
Anti-IgG de souris Anti-IgG de lapin Anti-IgG de rat	Peroxydase	chèvre	1/5000 ^{ème} WB	<i>Jackson ImmunoResearch</i>
Anti-IgG de rat Anti-IgG de cochon d'inde	Biotine	Lapin Chèvre	1/250 ^{ème} IH 1/250 ^{ème} IH	<i>Dako</i> <i>Jackson</i>

Tableau 3 : Anticorps secondaires utilisés.

IF : immunofluorescence ; WB : Western-blot ; IH : immunohistochimie.

3.3 Etude anatomique du cerveau des souris S^{-/-}

3.3.1 Dosage des protéines spécifiques de compartiments cellulaires par Western blot

3.3.2 Préparation d'échantillons

Une élévation cervicale est pratiquée sur des souris S^{+/+} et S^{-/-}. Les cerveaux disséqués sont ensuite placés dans un Daunce et broyés dans un volume ramené à 4 mL de tampon composé de 30 mM Tris HCl, pH, 6.8 ; 0.5mM EDTA ; 2% SDS ; cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche). Chaque broyat est chauffé à 95°C pendant 5 min puis mis sur glace. Le tout est ultracentrifugé 20 min à 100000 G puis le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C.

3.3.2.1 Electrophorèse des protéines en condition dénaturante (SDS-PAGE)

Les protéines sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, selon leur poids moléculaire. Avant d'être déposés sur gel, les échantillons sont dilués au 10-15ème selon la protéine à révéler et sont additionnés d'une solution de tampon dénaturant (Tampon G [5x]) contenant 125 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycérol, 100 mM DTT (Dithiothréitol), 1% bleu de Bromophénol, et portés à ébullition pendant 3 min. Lors de la migration les protéines sont séparées sur un gel contenant 8 à 12% d'une solution d'acrylamide/bis-acrylamide (Bio-Rad), selon le poids moléculaire de la protéine à mettre en

évidence. La migration est réalisée à 120 V dans un tampon Tris 50 mM pH 8,6, glycine 384 mM, SDS 1%, et est arrêtée lorsque le front de migration (coloré par le bleu de bromophénol) atteint la limite inférieure du gel. Le gel peut alors être soumis à un électrotransfert des protéines sur membrane pour une analyse ultérieure par immunodétection (Western-blot).

3.3.2.2 Electrotransfert

L'électrotransfert sur une membrane de nitrocellulose des protéines séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide est effectué pendant 1 h à 100 V dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM, méthanol 20% dans une cuve Mini Transblot (*Bio-rad*). Le transfert est contrôlé par une coloration réversible des protéines dans une solution de rouge ponceau (rouge Ponceau S 1%, acide trichloroacétique 0.3%, méthanol 50%). Cette coloration disparaît par lavage de la membrane à l'eau distillée.

3.3.2.3 Détection immunologique des protéines transférées sur membrane de nitrocellulose

Les sites aspécifiques présents sur la membrane sont saturés par incubation 1 h dans un tampon PBS contenant 5% de lait (Biorad). Après trois lavages de 10 minutes en 0.1% Tween PBS (PBST), la membrane est incubée pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBST. Après trois lavages de 10 min dans du PBST, la membrane est incubée pendant 1 h à RT avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Elle est ensuite lavée deux fois pendant 5 minutes dans du PBST puis une fois avec du PBS seul. Le kit ECL (« Enhanced Chemi-Luminescence », *Amersham Life Science*) permet révéler la peroxydase de raifort qui catalyse l'oxydation du luminol en présence d'eau oxygénée. Le luminol retourne ensuite à son état réduit en émettant une lumière captée par une caméra ultrasensible (Biorad).

3.3.2.4 Détermination des quantités des protéines et statistiques

Tous les échantillons de souris $S^{+/+}$, $S^{-/-}$ sont déposés sur un même gel pour chaque quantification. La révélation se fait par acquisition de l'accumulation du nombre de pixel du signal lumineux toutes les 30s, pendant 2 min 30 s, 5 min ou 10 min (Appareil Chemidoc, Biorad) (figure 26).

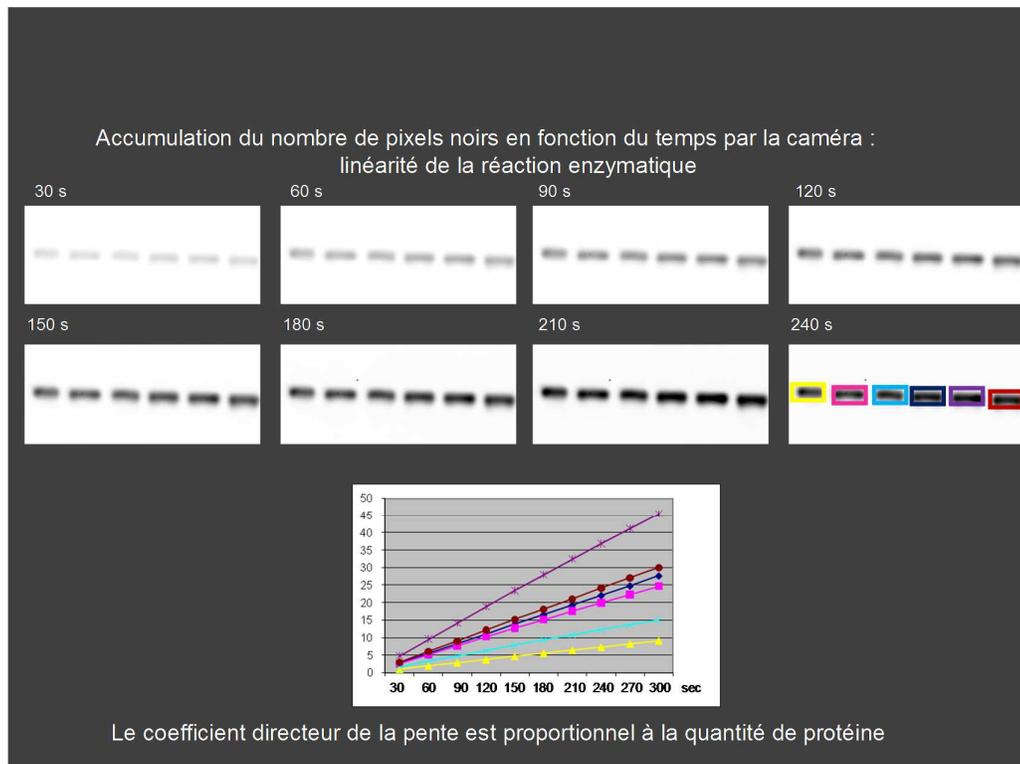


Figure 26 : Représentation schématique de la technique de révélation du Western blot quantitatif utilisée.

L'acquisition de l'accumulation du nombre de pixel, correspondant à la réaction enzymatique chromogène est enregistrée à des temps réguliers (ici, 30s). Le coefficient directeur est ensuite calculé à partir des données d'accumulation des pixels à chaque temps donné. La droite est linéaire, le coefficient directeur de la droite est donc proportionnel à la quantité de protéines déposées sur le gel.

Les mesures d'intensité de révélation sont réalisées à partir d'acquisition numérique en utilisant le logiciel imageJ. Les coefficients directeurs de la courbe de chaque cinétique sont calculés avec le logiciel Excel. La pente de la cinétique de révélation est proportionnelle à la quantité du marqueur révéle si, et seulement si, le signal de la bande reste 5 fois supérieur à celui du bruit de fond. Les ratios protéiques analysés correspondent au rapport des pentes S^{-} par rapport à $S^{+/+}$ pour chaque marqueur. La variance des ratios obtenus pour les n animaux a été calculée pour chaque marqueur protéique. La moyenne de ces variances [$S^2_{var} = 0,03259$] a été utilisée pour établir l'intervalle de confiance à 1% sur l'ensemble des marqueurs soit $1 \pm 0,222$ pour $n = 5$ (intervalle de confiance : [0,792 ; 1,208]). Pour chaque marqueur, nous avons réalisé, au préalable, une courbe de cinétique en fonction des quantités protéiques afin de vérifier que nous soyons bien dans la zone de linéarité de l'anticorps (figure 27).

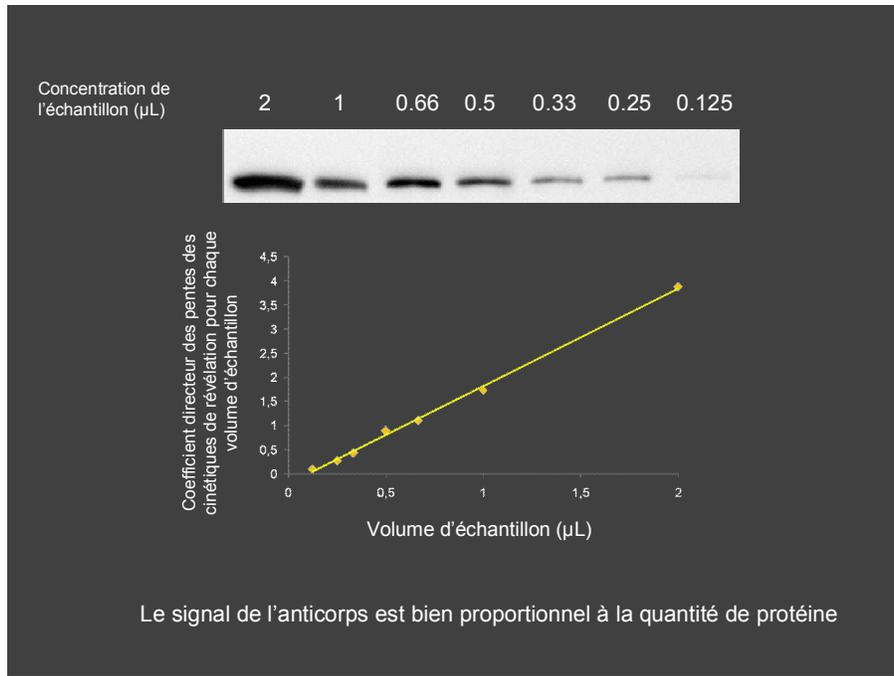


Figure 27 : Exemple de mesure de la linéarité du signal de l'anticorps en fonction de la quantité protéique déposée.

Anticorps utilisé : B III tubuline. Différentes quantités d'un même échantillon sont déposées. Le graphique montre bien que nous nous trouvons dans la zone de linéarité du signal de l'anticorps puisque le coefficient directeur de la cinétique de révélation est proportionnel à la quantité de protéine déposée sur le gel.

3.3.3 Analyse histologique des tracts myélinisés du cerveau des souris $S^{-/-}$ et $S^{+/+}$

3.3.3.1 Animaux utilisés

Les souris $S^{+/+}$, $S^{-/-}$ utilisées pour notre étude sont générées à partir de croisement de souris $S^{+/-}$ STOP 129 S2/SvPas et $S^{+/-}$ STOP C57BL/6. Notre étude utilise uniquement des femelles de la génération F1, âgées de 3-4 mois.

3.3.3.2 Sacrifice et préparation des cerveaux

Après anesthésie par une injection intrapéritonéale de pentobarbital (de 100 à 150 mg/kg), les souris sont fixées par perfusion intracardiaque de PBS (*tampon phosphate salin* : 130 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 5 mM Na_2HPO_4 , 1,7 mM KH_2PO_4 , Ph 7,4) puis par une solution de Paraformaldéhyde (PFA) à 4%. Les cerveaux sont prélevés et post-fixés une nuit à 4° dans du PFA 4% puis incubés 36h dans une solution de saccharose 30%. Enfin, les cerveaux sont congelés par inclusion dans du tissu-Tek R (Sakura) et conservés à -80°. Ensuite des coupes coronales de 30 µm (étude des tracts myélinisés) et 40 µm (étude histologique du fornix) des cerveaux sont réalisées au cryotome (Microm H 560). Les coupes

flottantes sont conservées dans une solution cryoprotectrice (pour 1L final : glycérol 200mL, tampon phosphate 125mL, éthylène glycol 300mL et 375mL d'eau distillée) à -20°C.

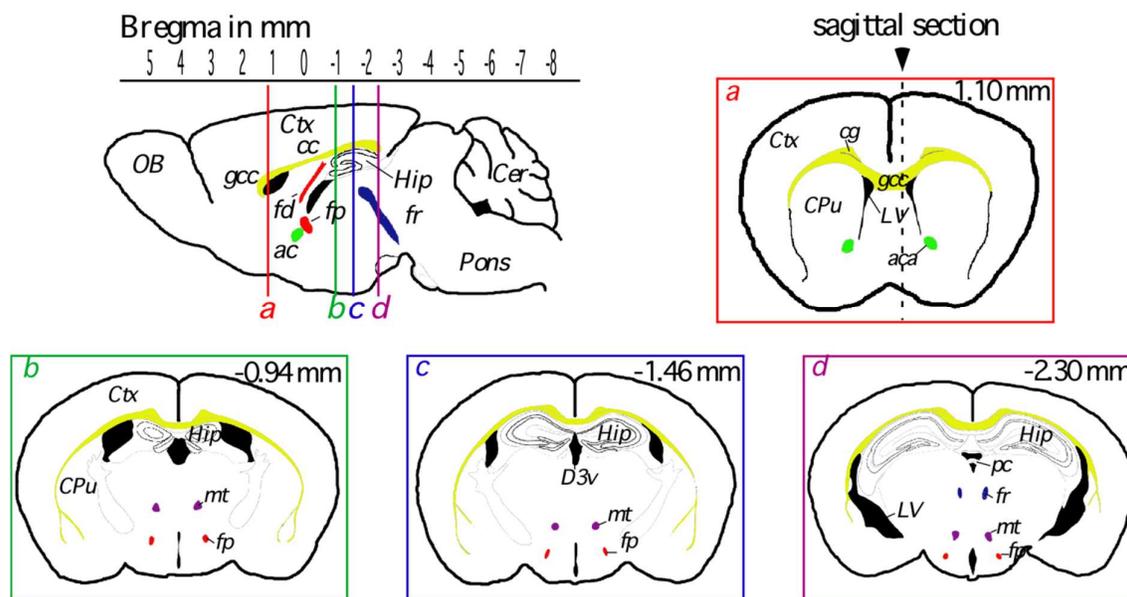
3.3.3.3 Coloration des coupes

- **Coloration au luxol fast blue**

Les coupes sont étalées sur lame Superfrost® puis séchées pendant 1h. Les coupes sont tout d'abord déshydratées dans un bain d'alcool à 95% puis incubées une nuit à 56° dans une solution de luxol (100mL d'alcool 95%, 0,1 mg de luxol fast blue, 0,5 mL d'acide acétique glacial). L'excès de colorant est enlevé par un bain d'alcool à 95%, les lames sont ensuite rincées dans de l'eau distillée. Les lames sont plongées dans un bain de carbonate de lithium (0,05 mg de carbonate de lithium, 100 mL d'eau distillée) pendant 30 secondes puis dans un bain d'alcool à 70% pendant 30 secondes puis rincées à l'eau distillée. Les étapes précédentes (carbonate de lithium et alcool à 70%) sont à renouveler tant que le contraste entre substance blanche et substance grise n'est pas satisfaisant. Les lames sont ensuite plongées pendant 5 minutes dans un bain de crésyl violet à 2,5% afin de colorer les corps cellulaires puis rincées dans de l'eau distillée. Pour contraster la coloration, les lames sont placées dans deux bains de deux minutes d'alcool successivement à 50%, 70%, 95%, 100%. Elles sont ensuite plongées dans un bain d'histolemon (5 min) puis montées avec du DPX (*Di-n-butylPhthalate in Xylene*).

- **Sélection des coupes pour l'étude de la surface des tracts myélinisés**

Pour chaque animal, 4 coupes flottantes ont été sélectionnées à la loupe binoculaire à partir des repères anatomiques décrits dans « The mouse brain » de Georges Paxinos, Keith.B.J.Franklin (figure 28).



Repère anatomique	Noms	Distance du bregma (mm)
<i>a</i>	Genou du corps calleux	1,10
<i>b</i>	Apparition du gyrus denté	-0,94
<i>c</i>	Hippocampe dorsal	-1,46
<i>d</i>	Apparition de la commissure postérieure	-2,30

Figure 28 : Représentation anatomique schématique des coupes coronales sélectionnées pour notre étude d'après l'atlas « the Mouse Brain » de G.Paxinos.

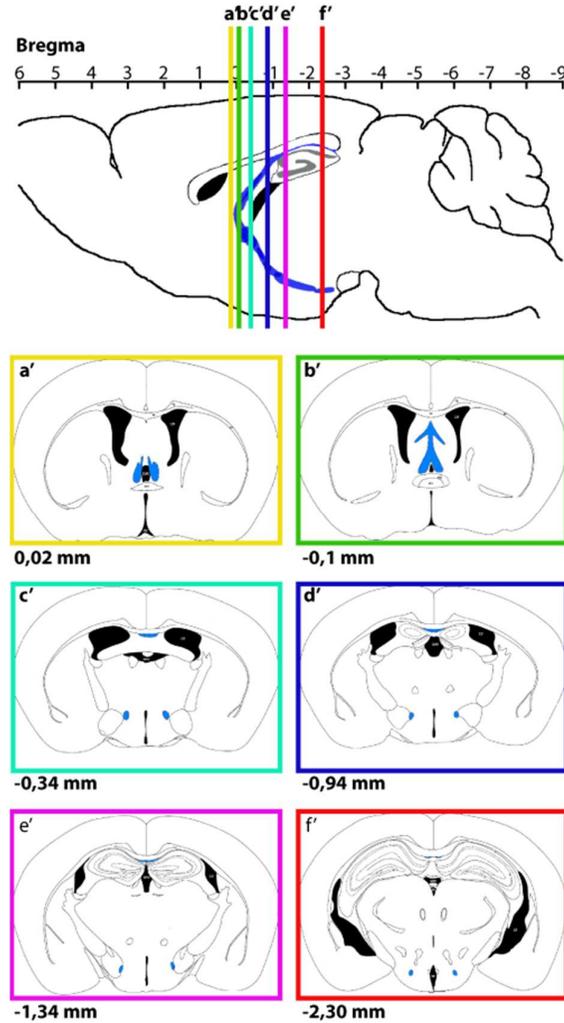
Les 4 plans coronaux annotés de *a* à *d* sont indiqués sur le plan sagittal où figure leur position par rapport au bregma crânien. Le trait discontinu situé sur le plan coronal *a* indique la position de la coupe sagittale. La position de chaque plan de coupe par rapport au Bregma est mentionnée en mm. Les principales structures sont indiquées par leur abréviation.

Abréviations :

OB : bulbe olfactif	Hip : hippocampe
Ctx : cortex	mt : faisceau mamillo-thalamique
gcc : genou du corps calleux	eg : cingulum
ac : commissure antérieure	CPu : striatum
aca : commissure antérieure, antérieure	
cer : cervelet	LV : ventricule latéral
3V : troisième ventricule	fi : fimbria
f : fornix	pc : commissure postérieure
D3V : troisième ventricule dorsal	fr : faisceau rétroflexe

- **Sélection des coupes pour l'étude du fornix**

Pour chaque animal, 6 coupes flottantes ont été sélectionnées à la loupe binoculaire à partir des repères anatomiques décrits dans « The mouse brain » de Georges Paxinos, Keith.B.J.Franklin (figure 29).



Repère anatomique	Noms	Distance du bregma (mm)
A'	Commissure dorso-ventrale du fornix	+0,02
B'	Accolement du fornix ventral avec le 3 ^{ème} ventricule	-0,10
C'	Partie du sm la plus large	-0,34
D'	Apparition du gyrus denté inférieur	-0,94
E'	Formation complète du gyrus denté	-1,34
F'	Limite entre hippocampe dorsal/ventral	-2,30

Figure 29 : Représentation anatomique schématique des coupes coronales sélectionnées pour l'étude du fornix d'après l'atlas « the Mouse Brain » de G.Paxinos.

- **Mesures et statistiques**

Les mesures sont réalisées à partir d'acquisition numérique en utilisant le logiciel imageJ. Les statistiques sont faites à partir d'Excel en appliquant un test de Student. Les valeurs sont considérées comme significatives quand $p < 0,05$.

3.3.4 Mise en évidence du fornix par traçage lipidique chez la souris

Des souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ sont perfusées comme décrit au préalable et les cerveaux, une fois extraits, sont conservés à 4°C dans du PFA 4 %. Les cerveaux sont ensuite coupés en deux au niveau de l'intersection entre les deux hémisphères. Une coloration partielle au bleu luxol durant 5 min de la surface du cerveau aura permis de distinguer le fornix (qui restera blanc puisqu'il se situe en profondeur de l'hémisphère, et donc la myéline le composant ne sera pas colorée) des autres commissures axonales (qui elles seront colorées en bleu puisque coupées). Un microcristal de Dil (molécule liposoluble capable de diffuser à travers les membranes lipidiques) est déposé dans le fornix. Le cerveau est ensuite réincubé dans de la PFA 4% au sein d'une étuve à 37°C pendant 12 semaines, le temps que le Dil diffuse tout au long du fornix. Les cerveaux sont ensuite inclus dans de l'agarose 4% puis des coupes sagittales de 50 μm sont effectuées au vibratome (Leica VP). Les coupes sont contre-colorées au Hoeschst dilué au 1/1000^{ème} dans du PBST pendant 10 minutes à température ambiante puis étalées sur lames Superfrost®. Le protocole identique pour le retraçage de la partie post-commissurale du fornix. Nous avons seulement injecté le Dil dans les corps mamillaires, région de projection du fornix.

Des reconstructions des coupes entières sont effectuées grâce au logiciel Metamorph et au microscope à fluorescence équipé d'une plateforme motorisée en x et y (Leica).

3.3.5 Traçage du fornix par injection cérébrale stéréotaxique de lentivirus chez la souris

3.3.5.1 Protocole expérimental d'infection lentivirale du subiculum dorsal

Les coordonnées des sites d'injection du lentivirus des souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ ont été établies par injection d'encre de chine dans le subiculum en partant des coordonnées préliminaires indiquées dans le livret stéréotaxique de Paxinos. Ensuite, les souris ont été sacrifiées, le cerveau congelé puis coupé au cryotome afin de repérer le site d'injection. Les coordonnées ont ensuite été ajustées en fonction de la position du site d'injection par rapport à celui désiré. De nouvelles injections ont été effectuées jusqu'à ce que le site d'injection soit positionné à l'endroit désiré.

Des souris femelles $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ âgées de 4 mois sont anesthésiées par injection en IP d'un cocktail de Kétamine (80-100 $\mu\text{g/g}$, Imalgéne®), Xylazine (10 $\mu\text{g/g}$, Rompun®). Une fois l'animal endormi, et fixé sur le cadre stéréotaxique (Kopff), de la lidocaïne (2%, Lurocaïne®) est appliquée localement sur le crâne au préalable tondu. Après avoir incisé le crâne au scalpel, de la Vétadine est appliquée sur l'os du crâne. Les Bregma et Lambda sont ensuite mesurées et les coordonnées d'injection calculées. Une fois le crâne percé, 0.75 μL de solution virale pure sont injectés au niveau du subiculum dorsal droite et gauche (coordonnées stéréotaxiques $S^{+/+}$: antéropostérieur : -3.3 mm, latéral : -1.65/+1.55 mm, profondeur : -1.8 mm. Coordonnées stéréotaxiques $S^{-/-}$: antéropostérieur : -3.2 mm, latéral : -1.6/+1.5 mm, profondeur : -1.62 mm) à l'aide d'une microseringue (Hamilton) de 5 μl placée sur une micropompe (marque) à vitesse de 0.15 $\mu\text{L}/\text{min}$. La canule est ensuite laissée 3 minutes en place du site d'injection puis relevée. Les deux sites d'injection sont ensuite désinfectés à la Vétadine puis la peau du crâne est suturée et enfin, l'animal est dégagé du cadre stéréotaxique. Après une injection en SC de Caprofène (5 $\mu\text{g/g}$ Rimadyl®) et de Borgal (24%), l'animal est maintenu jusqu'à son réveil dans une cage thermostatée à 30°C.

Deux semaines sont nécessaires à l'expression maximale du virus dans les neurones et à la diffusion de la GFP dans les neurites. Les animaux, une fois infectés sont donc sacrifiés 2 semaines après, comme décrit auparavant. Les cerveaux une fois prélevés sont conservés à 4°C puis inclus dans de l'agarose 4%. Des coupes sagittales de 50 μm flottantes sont alors effectuées au vibratome puis conservées dans du 0.01% Azide, PBS.

3.3.5.2 Mise en évidence du traçage lentiviral du fornix

Les coupes de cerveau d'animaux $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ infectés par le lentivirus sont contrecolorés par un marqueur neuronal fluorescent, le Nissl 435 (Molecular probes) dilué au 1/200^{ème} dans du PBST, une nuit à 4°C. Elles sont ensuite étalées sur lames Starfrost® puis analysées au microscope confocal (Zeiss). Les images sont acquises de manière séquentielle à l'aide du logiciel ZenSoftware (Zeiss).

3.3.6 Analyse histologique du subiculum dorsal chez la souris

Des souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ sont fixées et les cerveaux prélevés comme décrit au préalable puis des coupes flottantes coronales de 40 μm sont effectuées au vibratome. Elles sont ensuite perméabilisées par du Triton X100 0,5% GPI (Goat Prelmmun serum) 5% PBS pendant 1h. Après trois lavages en PBS de 10 min, l'anticorps primaire dirigé contre NeuN est ensuite incubé sur la nuit à 4°C dans du sérum de chèvre (GPI) 1% PBST, avant que les coupes ne subissent encore 3 lavages de 10 min en PBS. L'anticorps secondaire biotinilé dirigé contre les Ig de souris est alors incubé pendant 1 h à RT dans du GPI 1% PBST.

Après trois lavages de 10 min en PBS, les coupes sont mises en contact 1h avec la solution d'amplification du signal ABCComplex/HRP (Avidine aviaire, peroxydase de radis noir biotynilée, Kit DakoCytomation), puis rincées trois fois 10 min en PBS. La révélation de NeuN se fait grâce à l'ajout de la solution de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma) substrat de la peroxydase. Au bout de 6 min, une coloration noire apparaît. Une fois les coupes rincées, elles sont étalées sur lames Superfrost®. Les observations microscopiques et les acquisitions d'images ont été réalisées sur un microscope inversé (Carl Zeiss) équipé d'un appareil photo Nikon® coolpix et du logiciel ImageJ.

Les comptages de cellules NeuN dans le subiculum dorsal ainsi que la mesure de la surface de cette région sont effectués à l'aveugle. Les comparaisons de moyennes de la surface du subiculum et de sa densité cellulaire ont été effectuées à l'aide du test *t* non-paramétrique de Mann-Whitney recommandé pour les petits échantillons. Une différence sera significative vis-à-vis du groupe S^{+/+} si $p < 0,05$.

3.4 Etude de la neurogenèse adulte chez les souris

KO STOP

Après anesthésie par une injection intrapéritonéale de pentobarbital (de 100 à 150 mg/kg), les souris mâles et femelles âgés de trois à quatre mois sont fixés par perfusion intracardiaque de tampon phosphate salin (PBS : 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4) puis par une solution de PFA (PFA) à 4%. Les cerveaux sont prélevés et post-fixés une nuit à 4°C dans du PFA 4% puis incubés 36 h dans une solution de saccharose 30%. Enfin, les cerveaux sont congelés par inclusion dans du Tissu-Tek® (Sakura) et conservés à -80°C.

Afin de sélectionner les régions désirées, des coupes coronales des cerveaux sont effectuées au cryomicrotome (Microm). Pour l'étude de la cytogénèse, pour le BO (Repère anatomique : Bregma 4,28 mm à 3,56 mm), des coupes de 10 µm sont récupérées sur lames polylysine puis conservées à -80°C ; pour la ZSV et la partie antérieure de l'hippocampe, des coupes de 25 µm flottantes en PBS sont récoltées dans des plaques 48 puits et conservées à 4°C. Pour l'étude de la neurogenèse long terme (nombre de neurones *in fine*), des coupes de 15 µm sont récupérées sur lames Superfrost® pour le bulbe olfactif et des coupes de 25 µm flottantes en PBS de tout l'hippocampe sont récoltées dans des plaques 48 puits et conservées à 4°C. Pour l'étude du nombre de neuroblastes, des coupes coronales de 40 µm de l'hippocampe dorsal flottantes en PBS sont coupées au vibratome (Leica) et récupérées dans des plaques 48 puits et conservées à 4°C.

3.4.1 Etude de la prolifération des cellules souches et progéniteurs proliférant

3.4.1.1 Traitement des animaux par un marqueur nucléaire de la prolifération

La BromodésoxyUridine (BrdU) est un analogue de la thymidine capable de s'incorporer dans les cellules en phase S. La BrdU est administrée aux souris S^{+/+} et S^{-/-} pendant deux jours par deux injections intrapéritonéales quotidiennes à 100 mg/kg en PBS accompagnées de BrdU à 1 mg/mL en biberon. Les animaux sont ensuite sacrifiés comme décrit ci-dessus 24 h après la dernière injection de BrdU.

3.4.1.2 Méthode de révélation de la BrdU par immunohistochimie

Les coupes de cerveau sont perméabilisées par du Triton X100 0,5% PBS pendant 30 min. Après trois lavages en Tween 20 0.1% PBS (PBST) de 10 min, les coupes sont incubées dans une solution d'acide chloridrique 2 N pendant 30 min à 37°C, puis rincées trois fois 10 min dans du tampon borate 0,1 mM, pH 8,4. Après deux lavages de 10 min en PBST, l'anticorps primaire dirigé contre la BrdU est ensuite incubé sur la nuit à 4°C dans du sérum de chèvre (GPI) 5% PBST, avant que les coupes ne subissent encore 3 lavages de 10 min en PBST. L'anticorps secondaire biotinylé dirigé contre les Immunoglobulines (Ig) de rat est alors incubé pendant 1 h à RT dans du GPI 5% PBST. Après trois lavages de 10 min en PBS, les coupes sont mises en contact 1h avec la solution d'amplification du signal ABCComplex/HRP (Avidine aviaire, peroxydase de radis noir biotinylée, Kit DakoCytomation), puis rincées trois fois 10 min en PBS. La révélation de la BrdU se fait grâce à l'ajout de la solution de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma) substrat de la peroxydase. Au bout de 6 min, une coloration noire apparaît. Une fois les coupes rincées, elles sont étalées sur lames Superfrost®. Une contre-coloration de 30 secondes à l'hématoxyline-éosine est effectuée. Les observations microscopiques et les acquisitions d'images ont été réalisées sur un microscope droit Axioscop (Carl Zeiss) équipé d'une caméra RTE-CDD-Kodak 1 MHz (Princeton Instruments) et du logiciel Photoshop (Adobe). Les comptages de cellules BrdU⁺ sont effectués à l'aveugle.

3.4.1.3 Comptage des cellules BrdU⁺ et statistique

Pour la ZSV (Bregma 1,10 mm à 0,14 mm), une coupe sur 3 a été prélevée, soit 17 coupes en moyenne par animal ; pour l'hippocampe (Bregma -1,34 mm à -3,08 mm), une coupe sur 6 a été prélevée, soit 12 coupes en moyenne par animal. Pour la ZSV, les cellules BrdU⁺ bordant les couches adjacentes au ventricule ont été comptabilisées. Les comptages ont été effectués dans un carré de 500 µm sur 700 µm, sur les deux ZSV (droite et gauche)

de chaque coupe de cerveau. Pour l'hippocampe, les cellules ont été comptabilisées sur la totalité de la ZSG du gyrus denté (zone la plus intérieure du gyrus denté, bordant l'hilus). Pour chaque coupe de cerveau, les comptages ont été effectués sur les deux gyrus dentés et les deux hilus (droits et gauches).

Le nombre de cellules BrdU⁺ a été ramené au nombre de coupes totales obtenu pour chaque zone. Les comparaisons de moyennes ont été effectuées à l'aide du test *t* non-paramétrique de Mann-Whitney recommandé pour les petits échantillons. Une différence sera significative vis-à-vis du groupe S^{+/+} si $p < 0,05$.

3.4.2 Dosage du BDNF dans l'hippocampe

3.4.2.1 Préparation des échantillons

Les quantités de BDNF dans l'hippocampe sont mesurées par la technique ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Les souris S^{+/+} et S^{-/-} sont sacrifiées par dislocation cervicale et le cerveau est prélevé. Les hippocampes droits et gauches sont prélevés par dissection dans la glace et chaque hippocampe est séparé. Les différentes parties sont ensuite congelées à l'azote liquide puis conservées à -80°C. Elles sont ensuite broyées dans 200 µL de tampon de lyse (NaCl 137 mM, Tris-HCl 20 mM, Nonidet P-40 à 1% détergeant, 10% Glycerol, phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM, Aprotinine 10 µg/mL, Leupeptine 1µg/mL, sodium vanadate 0,5 mM) à l'aide d'un broyeur automatique de tissus (Sigma). Après sonication pendant 40 s, les échantillons sont centrifugés 20 minutes à 13000 rpm, 4°C et le surnageant est récupéré.

3.4.2.2 Dosage par ELISA

Les dosages de BDNF sont effectués à l'aide du kit de dosage BDNF Emax ImmunoAssay System (0 à 500 pg/mL) de chez Promega.

Les dosages se font dans une plaque 96 puits spécifiques pour les ELISA. Les puits sont recouverts d'anticorps de souris dirigés contre le BDNF (1/1000^{ème} en tampon bicarbonate de sodium 0,025 M, carbonate de sodium 0,025 M, pH 9,7), pendant une nuit à 4°C sans agitation. Après un lavage au tampon TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 %), les puits sont saturés par du tampon DPBS (pour 1L : 0.2 g KCl, 8 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 1.15 g Na₂HPO₄, 133 mg CaCl₂-2H₂O, 100 mg MgCl₂-6H₂O) 1h à température ambiante. Une fois les puits lavés au TBST, une gamme de dilution (de 7,8 pg à 500 pg/mL) d'une solution standard de BDNF (1µg/mL) est déposée dans une partie des puits ainsi que 50 µL des différents échantillons. Après 2h d'incubation, 5 lavages au TBST sont effectués et l'anticorps dirigé contre le BDNF humain (1/500^{ème} en tampon carbonate)

est incubé 2 h sous agitation à RT. Ensuite, après 5 lavages au TBST, l'anticorps secondaire dirigé contre les IgY, couplé à la HRP (1/200^{ème}) est incubé 1 h, RT. Une fois les puits lavés 5 fois au TBST, le signal est révélé par ajout de TMB et la réaction enzymatique bloquée ensuite par ajout d'HCL 1N. La lecture de la densité optique se fait à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque ELISA (Biorad) et du logiciel SoftMax.

Les comparaisons de moyennes de chaque dosage ont été effectuées à l'aide du test *t* non-paramétrique de Mann-Whitney recommandé pour les petits échantillons. Une différence sera significative vis-à-vis du groupe S^{+/+} si $p < 0,05$.

3.4.3 Etude de la neurogenèse long terme et survie neuronale

3.4.3.1 Marquage des neurones nouvellement générés par la technique de chasse de la BrdU

La BrdU est administrée aux souris S^{+/+} et S^{-/-} pendant quatre jours par deux injections intrapéritonéales quotidiennes à 50 mg/kg en PBS. Les animaux sont ensuite sacrifiés comme décrit auparavant 8 semaines après la dernière injection de BrdU.

3.4.3.2 Méthode de révélation des neurones nouvellement générés par immunofluorescence

Les coupes de cerveau sont étalées sur lame Superfrost® puis séchées deux heures à température ambiante. Trois lavages au PBS de 10 minutes permettront d'éliminer le reste de liquide cryoprotecteur. Après un rapide lavage à l'H₂O distillée, les coupes sont ensuite traitées au citrate (50µM) 15 minutes dans un « cuit vapeur » (Seb) chauffé à 90°C. Une fois refroidies, les coupes sont lavées successivement 3 fois au PBS. Elles sont ensuite perméabilisées par du Triton X100 0,5% GPI 5% PBS, pendant 30 min. Après trois lavages en PBS de 10 min, les anticorps primaires dirigés contre la BrdU et la protéine NeuN sont ensuite incubées sur la nuit à 4°C dans du sérum de chèvre (GPI) 5% PBS, avant que les coupes ne subissent encore 3 lavages de 10 min en PBS. Les anticorps secondaires dirigés contre les Ig de rat et de souris et couplés à l'Alexa Fluor 488 et à la Cyanine 3 sont alors incubés pendant 1 h à RT dans du GPI 5% PBST. Après trois lavages de 10 min en PBS, les lames sont ensuite montées avec du liquide de montage (Dako) et lamelles. Les observations microscopiques et les acquisitions d'images ont été réalisées sur un microscope confocal (Leica-TCS-ST2) et du logiciel LeicaConfocal Software. Les comptages des cellules BrdU⁺ /NeuN⁺ sont effectués à l'aveugle.

3.4.3.3 Comptage des cellules BrdU⁺ / NeuN⁺ et statistique

Pour le BO une coupe sur 5 a été prélevée, soit 5 coupes en moyenne par animal ; pour l'hippocampe (Bregma -1,34 mm à -3,08 mm), une coupe sur 6 a été prélevée, soit 12 coupes en moyenne par animal. Les comptages des cellules BrdU⁺/NeuN⁺ ont été effectués dans l'intégralité de la zone granulaire de chaque coupe de BO à partir des acquisitions faites au microscope confocal et à l'aide du logiciel ImageJ. Pour l'hippocampe, les cellules BrdU⁺/NeuN⁺ ont été comptabilisées sur la totalité de la zone granulaire de chaque gyrus denté. Pour chaque coupe de cerveau, les comptages ont été effectués sur les deux gyrus dentés (droits et gauches). Le nombre de cellules BrdU⁺/NeuN⁺ a été quantifié sur le microscope confocal directement par l'analyse de la totalité de la profondeur de la coupe avec un retranchement de 0.5 µm afin d'exclure les faux doublement positifs.

Le nombre de cellules BrdU⁺/NeuN⁺ a été ramené au nombre de coupes totales obtenu pour chaque zone. Les comparaisons de moyennes ont été effectuées à l'aide du test *t* non-paramétrique de Mann-Whitney recommandé pour les petits échantillons. Une différence sera significative vis-à-vis du groupe S^{+/+} si $p < 0,05$.

3.4.4 Etude de la production de neurones immatures dans l'hippocampe

3.4.4.1 Méthode de révélation des neurones immatures

Les coupes d'hippocampe sont perméabilisées par du Triton X100 0,5% GPI 5% PBS pendant 1h. Après trois lavages en PBS de 10 min, l'anticorps primaire dirigé contre la DCX est ensuite incubé sur la nuit à 4°C dans du sérum de chèvre (GPI) 1% PBST, avant que les coupes ne subissent encore 3 lavages de 10 min en PBS. L'anticorps secondaire biotinilé dirigé contre les Ig de cochon d'inde est alors incubé pendant 1 h à RT dans du GPI 1% PBST. Après trois lavages de 10 min en PBS, les coupes sont mises en contact 1h avec la solution d'amplification du signal ABCComplex/HRP (Avidine aviaire, peroxydase de radis noir biotinilée, Kit DakoCytomation), puis rincées trois fois 10 min en PBS. La révélation de la DCX se fait grâce à l'ajout de la solution de 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Sigma) substrat de la peroxydase. Au bout de 6 min, une coloration noire apparaît. Une fois les coupes rincées, elles sont étalées sur lames Superfrost®. Les observations microscopiques et les acquisitions d'images ont été réalisées sur un microscope inversé (Carl Zeiss) équipé d'un appareil photo Nikon coolpix et du logiciel ImageJ. Les comptages de cellules DCX⁺ sont effectués à l'aveugle.

3.4.4.2 Comptage des cellules DCX⁺, étude de la persistance des embranchements dendritiques des cellules DCX⁺ et statistique

Pour l'hippocampe (Bregma -1,34 mm à -3,08 mm), une coupe sur 6 a été prélevée, soit 6 coupes en moyenne par animal. Les cellules DCX⁺ ont été comptabilisées sur la totalité de la ZG du gyrus denté. Pour chaque coupe de cerveau, les comptages ont été effectués sur les deux gyrus dentés et les deux hilus (droits et gauches). Le nombre de cellules DCX⁺ a été ramené au nombre de coupes totales obtenu. Les comparaisons de moyennes ont été effectuées à l'aide du test *t* non-paramétrique de Mann-Whitney recommandé pour les petits échantillons. Une différence sera significative vis-à-vis du groupe S^{+/+} si $p < 0,05$.

Pour l'étude de la persistance des embranchements dendritiques des cellules DCX, nous avons délimité trois niveaux : le niveau 1 correspond à la limite en la couche granulaire et la couche moléculaire du gyrus denté de l'hippocampe. Les niveaux deux et trois sont des lignes imaginaires coupant en 3 la couche moléculaire du gyrus denté de façon équitable. Les pics d'intensité de fluorescence correspondant au marquage DCX sont ensuite comptabilisés sur chaque niveau à l'aide du logiciel ImageJ et reportés sur un tableau Excel. Nous avons vérifié ensuite que chaque pic d'intensité correspondait bien au croisement d'un branchement DCX positif sur le niveau et non à du bruit de fond. La persistance des branchements tout au long des trois niveaux est calculée en effectuant le rapport, dans un premier temps, du nombre de pics d'intensité du niveau 2 par rapport au niveau 1, et dans un deuxième temps, du nombre de pics d'intensité du niveau 3 par rapport au niveau 2. Les comparaisons de moyennes des ratios ont été effectuées à l'aide du test *t* non-paramétrique de Mann-Whitney recommandé pour les petits échantillons. Une différence sera significative vis-à-vis du groupe S^{+/+} si $p < 0,05$.

3.4.5 Etude de la maturation morphologique des neurones immatures néoformés du gyrus denté par infection rétrovirale

L'infection des cellules souches et progénitrices localisées dans la ZSG du gyrus denté par des rétrovirus codant pour la GFP permet de suivre les différentes étapes de leur différenciation en neurones.

3.4.5.1 Retrovirus

Le vecteur utilisé est le pQCXIP-GFP/VSV-G (voir carte génomique figure 57A). L'insert, de classe 1, code pour la GFP (Green Fluorescent Protein). L'encapsidation et la production du rétrovirus sont effectuées par Nicole Déglon, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Institut d'Imagerie BioMédicale (I2BM), Service MIRGen.

3.4.5.2 Analyse du patron cellulaire d'infection du rétrovirus

- **Obtention de la suspension cellulaire et mise en culture**

Les cultures de neurones sont préparées à partir d'hippocampes d'embryon de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ âgés de 18,5 jours. Pour chaque embryon, les hippocampes sont prélevés sous une loupe binoculaire à l'aide de pinces fines et ciseaux, puis déposés dans 4,5 ml de milieu HBSS (*Invitrogen*). Les ponts intercellulaires sont ensuite dissociés de manière chimique par incubation des cellules dans 5 ml de milieu HBSS, trypsine 0,05%, EDTA 0,53 mM pendant 15 min à 37°C. Après trois rinçages avec du HBSS, 500 µl de milieu DMEM, 10% SVF, Penicilline 100 U.ml⁻¹, Streptomycine 100 µg.ml⁻¹ sont ajoutés et les cellules sont dissociées mécaniquement à l'aide d'une pipette Pasteur stérile d'ouverture moyenne. La suspension cellulaire est ensuite déposée dans une boîte de culture préalablement conditionnée à une densité d'environ 150 000 cellules / boîte (1000 cellules/cm²). Une heure plus tard, le DMEM, 10% SVF est remplacé par du milieu Neurobasal contenant 2% de supplément B-27 (*Invitrogen*) et du Gluthamax 200 mM. La culture est maintenue pendant 20 jours dans une étuve à 37° C sous une atmosphère de 5% CO₂ et 98% d'humidité.

- **Infection rétrovirale**

Pour les infections virales, les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre à raison de 15000 cellules/ml dans des plaques 24 puits (1 lamelle par puits). L'infection rétrovirale des cellules est réalisée 48 h après l'ensemencement par ajout de 10 µL de solution virale diluée aux 1/2 puissances 6. Les cultures sont maintenues 48 h, 1 semaine ou 2 semaines à 37°C, en atmosphère humide, contenant 5% de CO₂ avant d'être utilisées pour des expériences d'immunofluorescence. Elles sont ensuite incubées à 37° C pendant 20 minutes avec une solution de PFA/Sucrose (PFA 4%, saccharose 120mM, qsp PBS). Après 2 lavages dans du PBS, les cellules sont perméabilisées 5 minutes dans du PBS, Triton X-100 0,2%. Le Triton est ensuite éliminé par 2 lavages successifs avec du PBS.

- **Immunomarquage**

Après réhydratation des cellules dans du PBS - Tween 20 0,1% (PBST), les lamelles sont recouvertes d'une solution de PBST contenant les anticorps primaires dirigés contre la GFP, NG2, RC2, GFAP, DCX et NeuN pendant une nuit à 4°C. Les lamelles sont ensuite lavées dans du PBST puis sont incubées 1 h à RT et à l'obscurité avec les anticorps secondaires correspondants. L'ADN des cellules est ensuite coloré avec un agent intercalent, l'Hoeschst 33258 (1 µg/ml) pendant cinq minutes. Les lamelles sont séchées puis montées sur des lames starfrost® à l'aide du liquide de montage FluorSave™

(*Calbiochem*). Les cellules sont observées au microscope confocal (*Zeiss*) et les acquisitions d'images sont effectuées à l'aide du logiciel ZenSoftware (*Zeiss*).

3.4.5.3 Protocole expérimental d'infection rétrovirale du gyrus denté

Les coordonnées des sites d'injection du lentivirus des souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ ont été établies par injection d'encre de chine dans la zone sous granulaire du gyrus denté de l'hippocampe en partant des coordonnées préliminaires indiquées dans le livret stéréotaxique de Paxinos. Ensuite, les souris ont été sacrifiées, le cerveau congelé puis coupé au cryotome afin de repérer le site d'injection. Les coordonnées ont ensuite été ajustées en fonction de la position du site d'injection par rapport celle désirée. De nouvelles injections ont été effectuées jusqu'à ce que le site d'injection soit positionné à l'endroit désiré.

Des souris femelles $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ âgées de 2 mois sont anesthésiées par injection en ip d'un cocktail de Kétamine (80-100 $\mu\text{g/g}$, Imalgène®), Xylazine (10 $\mu\text{g/g}$, Rompun®). Une fois l'animal endormi, et fixé sur le cadre stéréotaxique (Kopff), de la lidocaine (2%, Lurocaïne®) est appliquée localement sur le crâne au préalable tondu. Après avoir incisé le crâne au scalpel, de la vétadine est appliquée sur l'os du crâne. Les Bregma et Lambda sont ensuite mesurées et les coordonnées d'injection calculées. Une fois le crâne percé, 0.75 μL de solution virale pure sont injectés au niveau du gyrus denté dorsal droite et gauche (coordonnées stéréotaxiques $S^{+/+}$: antéropostérieur : -2.2 mm, latéral : +/- 1.5 mm, profondeur : -2.1 mm. Coordonnées stéréotaxiques $S^{-/-}$: antéropostérieur : -2.1 mm, latéral : +/- 1.42 mm, profondeur : -1.99 mm) à l'aide d'une microseringue (Hamilton) de 5 μl placée sur une micropompe (marque) à vitesse de 0.15 $\mu\text{L}/\text{min}$. La canule est ensuite laissée 3 minutes en place du site d'injection puis relevée. Les deux sites d'injection sont ensuite désinfectés à la vétadine puis la peau du crâne est suturée et enfin, l'animal est dégagé du cadre stéréotaxique. Après une injection en SC de caprofène (5 $\mu\text{g/g}$ Rimadyl®) et de Borgal (24%), l'animal est maintenu jusqu'à son réveil dans une cage thermostatée à 30°C jusqu'à son réveil complet.

Six semaines sont nécessaires aux neurones néoformés pour s'intégrer définitivement dans le réseau neuronal préexistant. Les animaux, une fois infectés sont sacrifiés soit 2 semaines, 4 semaines ou 6 semaines après, comme décrit auparavant. Les cerveaux une fois prélevés sont conservés à 4°C puis inclus dans de l'agarose 4%. Des coupes coronales de 40 μm flottantes sont alors effectuées au vibratome puis conservées dans du 0.01% Azide, PBS.

3.4.5.4 Mise en évidence des cellules infectées par le rétrovirus et analyse de la cinétique de la neurogenèse adulte hippocampale

Les coupes de cerveau d'animaux $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ sont perméabilisées par du Triton X100 0,5%, GPI 5% PBS pendant 1h. Après trois lavages en PBS, les anticorps primaires (GFP, GFAP, DCX, NeuN) sont incubés sur la nuit à 4°C dans du GPI 1% PBST, avant que les coupes ne subissent encore 3 lavages de 10 min en PBS. Les anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les Ig de lapin, rat, souris ou cochon d'inde et couplés à l'Alexa Fluor 488, Cyanine 3 et/ou Cyanine 5 sont alors incubés pendant 1h à RT dans du GPI 1% PBST. Après trois lavages de 10 min en PBST, l'ADN est coloré à l'Hoechst 33258 à 1µg/mL dans du PBST pendant 10 min. Les coupes sont ensuite étalées sur lames Starfrost® puis analysées au microscope confocal (Zeiss). Les images sont acquises de manière séquentielle à l'aide du logiciel ZenSoftware (Zeiss).

3.4.5.5 Comptage des cellules DCX^{+}/GFP^{+} et $NeuN^{+}/GFP^{+}$ et statistique

Les cellules DCX^{+}/GFP^{+} (neurones immatures nouvellement générés) et $NeuN^{+}/GFP^{+}$ (neurones matures nouvellement générés) ont été comptabilisées sur la totalité de la ZG du gyrus denté et sur la totalité des coupes présentant une fluorescence de la GFP d'animaux sacrifiés après 2 semaines et 4 semaines d'infection rétrovirale. Pour chaque coupe de cerveau, les comptages ont été effectués sur les deux gyrus dentés (droits et gauches).

Les nombres de cellules DCX^{+}/GFP^{+} et $NeuN^{+}/GFP^{+}$ ont été ramenés au nombre de coupes totales obtenu. Les comparaisons de moyennes ont été effectuées à l'aide du test *t* non-paramétrique de Mann-Whitney recommandé pour les petits échantillons. Une différence sera significative vis-à-vis du groupe $S^{+/+}$ si $p < 0,05$.

3.4.6 Analyse du patron d'expression de STOP dans les zones germinatives : détection de la β -galactosidase par immunofluorescence

3.4.6.1 Anticorps primaires

La β -galactosidase et les marqueurs spécifiques des différents types cellulaires impliqués dans le processus de la neurogenèse adulte sont révélés par double ou triple marquages. Le tableau suivant répertorie les marqueurs utilisés ainsi que leurs anticorps associés.

Marqueur	Type cellulaire associé
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Filament intermédiaire spécifique des astrocytes corticaux et cellules souches neurales (astrocytes immatures)
Doublecortine (DCX)	Protéine associée aux microtubules exprimée par les neuroblastes et les neurones immatures
Neuron Nucleus protein (NeuN)	Protéine nucléaire exprimée par les neurones immatures et matures
β -galactosidase (β -gal)	Gène rapporteur traduisant l'expression de STOP chez les souris $S^{+/-}$ et $S^{-/-}$

3.4.6.2 Méthode de marquage

Les coupes de cerveau d'animaux $S^{+/-}$ sont perméabilisées par du Triton X100 0,5% PBS pendant 30 min. Après trois lavages en PBST, les anticorps primaires (GFAP, DCX, NeuN, β -galactosidase) sont incubés sur la nuit à 4°C dans du GPI 5% PBST, avant que les coupes ne subissent encore 3 lavages de 10 min en PBST. Les anticorps secondaires de chèvre dirigés contre les Ig de lapin, souris ou cochon d'inde et couplés à l'Alexa Fluor 488, Cyanine 3 et/ou Cyanine 5 sont alors incubés pendant 1h à RT dans du GPI 5% PBST. Après trois lavages de 10 min en PBST, l'ADN est coloré à l'Hoechst 33258 à 1 μ g/mL dans du PBST pendant 10 min. Les coupes sont ensuite étalées sur lames Starfrost® puis analysées au microscope confocal (Leica-TCS-ST2). Les images sont acquises de manière séquentielle à l'aide du logiciel Leica Confocal software.

4 Résultats et Discussion

4.1 Première partie : étude histologique et anatomique du cerveau des souris KO STOP

De nombreux modèles animaux de schizophrénie présentent des troubles fonctionnels et comportementaux, mais peu d'entre eux arrivent à retranscrire les troubles anatomiques associés dans le cerveau. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la souris $S^{-/-}$, présente à la fois des troubles fonctionnels et comportementaux associés à la schizophrénie.

De récentes études par IRM menées au laboratoire ont permis de mettre en évidence une réduction globale du volume cérébral d'environ 15 % chez la souris $S^{-/-}$ et ce, quelque soit le fond génétique utilisé. Cette diminution s'accompagne d'un élargissement des ventricules latéraux (figure 30). Ces phénotypes sont aussi des caractéristiques récurrentes chez les patients schizophrènes humains. Elles sont cependant très peu représentées dans la plupart des modèles murins apparentés à la schizophrénie, excepté le mutant pour DISC1 « L100P » (Clapcote et al., 2007; Desbonnet et al., 2009). Bien que la majorité des études par imagerie cérébrale (IRM et DTI) mettent en évidence une réduction du volume cérébral dans plusieurs pathologies psychiatriques (schizophrénie, dépression), l'origine tissulaire, cellulaire et moléculaire de cette réduction reste contradictoire et mal caractérisée. En effet, les études histologiques montrent que cette réduction de volume pourrait être la conséquence soit d'une diminution du nombre de cellules dans certaines régions du cerveau (voir introduction, paragraphe 2.1.3), soit d'une altération dendritique, synaptique ou dans d'autres études, une réduction du neuropil (Bulinski et al., 1998; Selemon and Goldman-Rakic, 1999). La disparité des compartiments cellulaires incriminés dans les pertes de volume cérébral peut être aussi la conséquence de la qualité de conservation des tissus post-mortem, mais aussi de la nature des antipsychotiques utilisés dans le traitement des malades. En effet, certains neuroleptiques provoquent, à long terme, une nécrose de certaines régions cérébrales (Holtom et al., 2000). Par ailleurs, la prise de stupéfiants et l'alcoolisme, fréquentes chez les schizophrènes, peuvent complexifier le tableau clinique neuroanatomique (Poirier et al.).

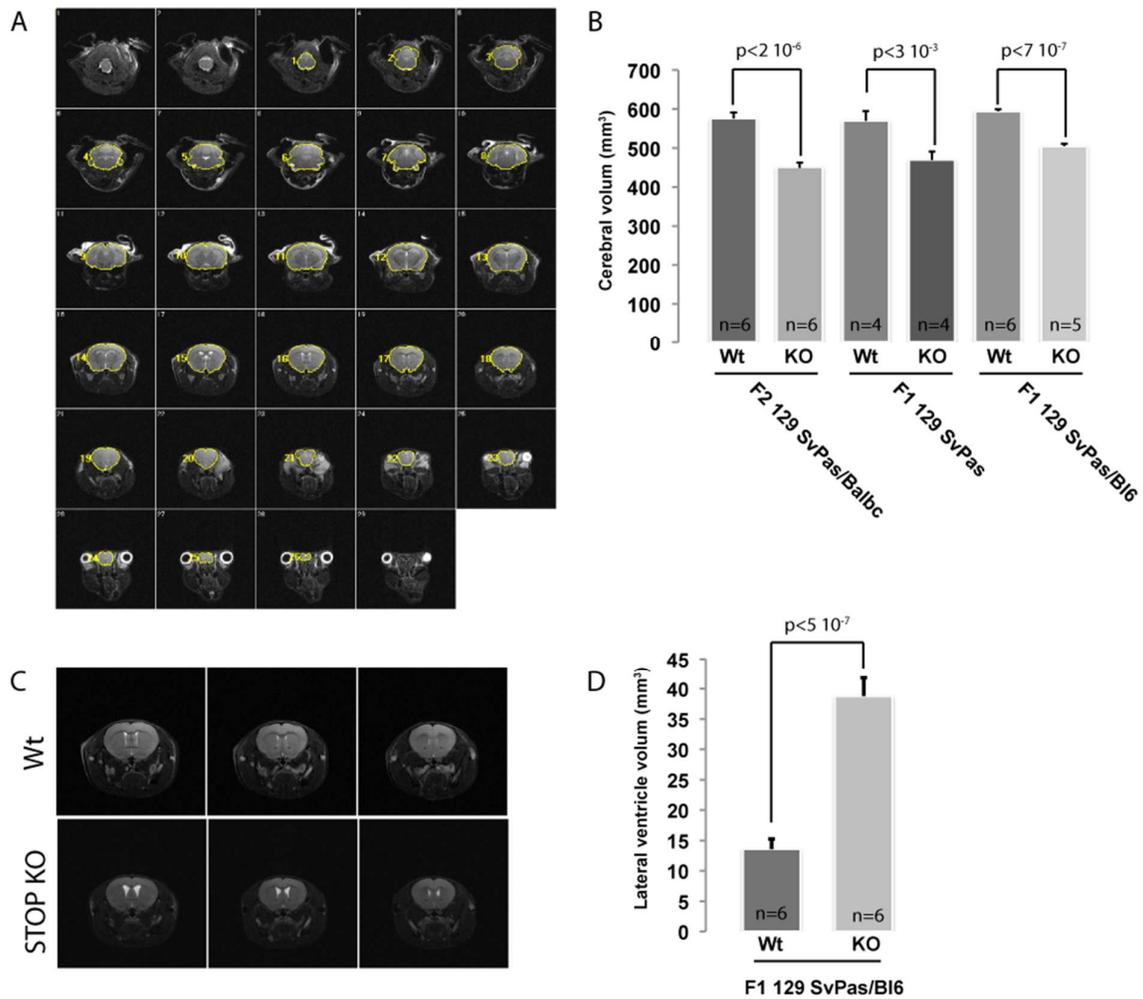


Figure 30 : Analyse par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) du volume cérébral des souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$
A : galerie représentative des sections successives d'IRM de cerveau utilisées pour la détermination du volume cérébral des souris. **B** : Histogramme représentatif des mesures de volume cérébral en IRM pour les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ des fonds génétiques 129SvPas/B16, 129SvPas et 129SvPas/BalbC. **C** : galerie représentative d'IRM de cerveau utilisées pour la détermination du volume des ventricules des souris. **D** : Histogramme représentatif des mesures de volume des ventricules latéraux en IRM pour les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ des fonds génétiques 129SvPas/B16.

La souris $S^{-/-}$ constitue alors un modèle intéressant afin de mieux comprendre les déficits tissulaires et cellulaires voire, subcellulaires associés à une diminution de volume cérébral. Afin de savoir si un compartiment cellulaire était plus spécifiquement altéré dans le cerveau des souris $S^{-/-}$, nous avons décidé d'analyser et de comparer quantitativement, par la technique de Western Blot, divers marqueurs cellulaires du cerveau. Cette première approche devait également permettre d'orienter nos études histologiques.

4.1.1 Conséquence de l'absence de STOP sur le contenu protéique du cerveau

4.1.1.1 Analyse comparative de la quantité protéique totale des cerveaux des souris $S^{-/-}$ et $S^{+/+}$

Dans le but de comparer les variations de quantités de protéines totales relatives à la réduction du volume cérébral, les cerveaux des souris $S^{+/+}$, $S^{-/-}$ et $S^{+/-}$ ont été homogénéisés dans un volume final de 4 mL. La présence de 2% de SDS dans le tampon d'homogénéisation permet de solubiliser une grande partie des protéines, qu'elles soient synaptiques, myéliniques ou nucléaires. Nous avons ensuite quantifié le contenu général en protéines dans les extraits totaux de cerveaux de souris $S^{+/+}$, $S^{+/-}$ et $S^{-/-}$ grâce à un simple dosage protéique par la méthode BCA (figure 31).

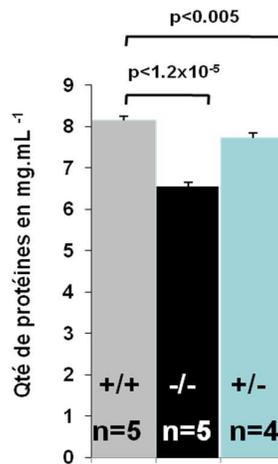


Figure 31 : Quantification protéique, par la méthode BCA, des broyats de cerveaux de souris $S^{+/+}$, $S^{-/-}$ et $S^{+/-}$, de fond génétique 129SvPas/Bl6.

Histogramme représentatif des moyennes des quantités protéiques des broyats de cerveaux de souris $S^{+/+}$, $S^{+/-}$ et $S^{-/-}$.

Ainsi, la quantité globale de protéines du cerveau des souris $S^{-/-}$ est réduite de 15% (figure 31 : $S^{+/+}$: 8,15 mg.mL⁻¹, n = 5 ; $S^{-/-}$: 7,72 mg.mL⁻¹, n = 5 ; p < 1.2 10⁻⁵). Cette diminution corrèle parfaitement à celle observée pour les volumes cérébraux, mais aussi celle du poids humide des cerveaux des souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ (12.5% : $S^{+/+}$: 0,556 g, n = 5 ; $S^{-/-}$: 0,486 g, n = 6, p < 0,05). Le contenu en protéines du cerveau de souris $S^{+/-}$ est aussi réduit significativement de 7% par rapport aux souris sauvages (figure 31, $S^{+/+}$: 8,15 mg.mL⁻¹, n = 5 ; $S^{+/-}$: 7,9 mg.mL⁻¹, n = 4 ; p < 0,005). La quantité en protéines des cerveaux $S^{-/-}$ diffère aussi significativement de celle des $S^{+/-}$, ce qui montre que les souris $S^{+/-}$ pourraient présenter certains phénotypes intermédiaires par rapport aux souris $S^{-/-}$.

4.1.1.2 Analyse comparative du contenu protéique de cerveau à partir d'extraits totaux de cerveaux de souris S^{+/+} et S^{-/-}

Ces résultats nous ont poussés à nous demander si la quantité de toutes les protéines du cerveau diminuait de 12% ou bien si cette réduction concernait un compartiment cellulaire spécifique du cerveau : population cellulaire en particulier (neurones, glie...), noyaux, neuropil, synapses. Pour cela, nous avons quantifié, par western blot quantitatif, toute une batterie de protéines spécifiques :

- Marqueurs généraux (nucléaires, cytosquelettiques)
- Marqueurs gliaux et myéliniques
- Marqueurs neuronaux (axonaux, dendritiques et synaptiques)

Afin de savoir si la diminution des marqueurs cellulaires était proportionnelle à la réduction du volume cérébral, nous avons déposé le même volume pour chaque échantillon (voir matériel et méthodes).

De façon générale, l'analyse de la quantité de chaque marqueur a été effectuée au moins trois fois. Si l'on regroupe les ratios S^{-/-} par rapport à S^{+/+} obtenus pour chaque marqueur, nous obtenons un ratio moyen de 0,87 (0.87 +/- 0.006, n = 30) significativement différent de 1. Cela indique que les marqueurs protéiques choisis semblent représentatifs de l'ensemble des protéines du cerveau des souris S^{-/-}. De plus, la répartition des mesures de variance pour les différents animaux utilisés vis-à-vis des différents marqueurs protéiques nous a permis de calculer un intervalle de confiance général d'amplitude 0,222 au risque de 1%. Un ratio dont la valeur serait inférieure à 0,778 indiquera un marqueur dont le contenu diminue significativement chez les animaux S^{-/-}, par rapport aux animaux S^{+/+}, au risque 1% (voir matériels et méthodes). Cette diminution globale corrèle parfaitement avec les réductions de volume, de poids ainsi que de la quantité de protéine totales cérébrales des souris S^{-/-}. Nous pourrions donc penser, à ce stade de notre étude, que toutes les protéines diminueraient de 13% dans les cerveaux des souris S^{-/-}, en d'autres termes, qu'il y aurait un peu moins de tout dans ces cerveaux. La suite de notre étude et l'analyse des marqueurs cellulaires pris individuellement vont montrer qu'il n'en est rien.

- **Marqueurs généraux nucléaires et cytosquelettiques**

Nous avons voulu savoir, en premier lieu, si la réduction du volume cérébral chez les souris S^{-/-} était accompagnée d'une diminution de la quantité cellulaire. Pour cela, nous avons analysé et comparé le contenu cérébral de plusieurs protéines nucléaires ubiquitaires : les isoformes de Lamine A, B et C ainsi que la protéine Histone H2b (figure 32Aab). Les lamines sont des protéines fibrillaires appartenant à la famille des filaments intermédiaires de

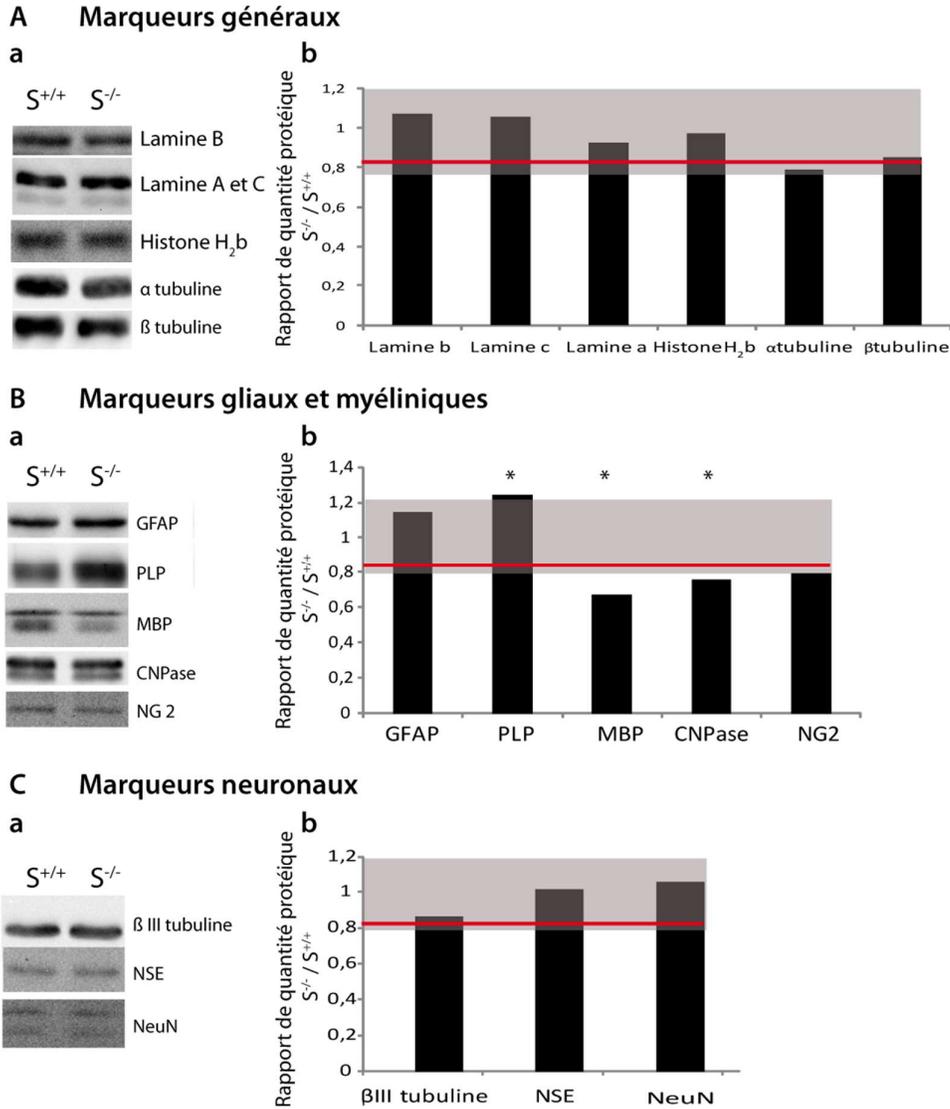


Figure 32 : Quantification par Western Blot de marqueurs ubiquitaires, neuronaux, gliaux et myéliniques contenus dans les cerveaux de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$. Partie 1.

A : Analyse quantitative du contenu protéique cérébral en marqueurs ubiquitaires généraux : Lamine a, b et c, Histone H₂b, α et β tubuline. **B** : Analyse quantitative du contenu protéique cérébral en marqueurs gliaux et myéliniques : GFAP, PLP, MBP, CNPase et NG2. **C** : Analyse quantitative du contenu protéique cérébral en marqueurs ubiquitaires neuronaux : β III tubuline, NSE, NeuN. Pour A, B et C, **a** : photographie représentative des bandes protéiques de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ spécifiques de chaque marqueur analysé, révélées à l'aide d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) spécifique de l'anticorps primaire, par Western Blot. **b** : Histogramme représentatif des moyennes des ratios des quantités protéiques de chaque marqueur analysé de souris $S^{-/-}$ par rapport aux souris $S^{+/+}$ ($S^{-/-}/S^{+/+}$). Le trait rouge indique le ratio 0.87 correspondant à la moyenne générale des ratios $S^{-/-}/S^{+/+}$. Les limites des zones gris foncé correspondent à un intervalle de confiance au risque 1% à l'intérieur duquel les quantités protéiques sont identiques dans les deux génotypes ($S^{+/+}$ et $S^{-/-}$). Nombre d'animaux utilisés : $S^{+/+}$ n=5, $S^{-/-}$ n=5.

type V. Par appariement à des protéines membranaires spécifiques du noyau, les lamines forment la membrane interne du noyau, appelée aussi lamina nucléaire. L'histone H2b est une protéine nucléaire ubiquitaire s'associant à l'ADN pour former les nucléosomes. La figure 32 montre parfaitement que les quantités de lamines et d'histone ne changent pas significativement entre les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ (figure 32Ab : Ratios protéiques $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ des lamines A : 0,92 ; lamines B : 1,06 ; lamines C : 1,05 ; Histone H2b : 0,97 ; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5). Les ratios restent très proches de 1 et sont tous contenus dans l'intervalle de confiance défini précédemment. Ces résultats montrent clairement que malgré la baisse de volume, du poids et des protéines totales cérébrales, nous ne visualisons pas de différence significative dans les quantités de ces marqueurs nucléaires entre les souris sauvage et $S^{-/-}$. Si l'on considère que la quantité de ces marqueurs est proportionnelle à la quantité de cellules, nos résultats suggèrent que le nombre global des cellules des cerveaux de souris $S^{-/-}$ reste identique à ceux des animaux sauvages.

La protéine STOP étant considérée comme une MAP, nous voulions savoir si les constituants microtubulaires du cerveau des souris $S^{-/-}$ étaient affectés. Ainsi, les analyses en α et β tubuline révèlent qu'il n'y a aucune différence significative dans la quantité de ces protéines ubiquitaires entre les cerveaux de souris $S^{-/-}$ et $S^{+/+}$ (figure 32Ab : Ratios protéiques $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ d' α tubuline : 0,78, $p > 0,01$; β tubuline : 0,85, $p > 0,01$; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5).

- **Marqueurs gliaux, astrocytaires, et myéliniques**

Pour analyser des marqueurs spécifiques de types cellulaires cérébraux, nous avons tout d'abord analysé la quantité d'un marqueur spécifique des astrocytes, la GFAP. Cette protéine appartient à la famille des filaments intermédiaires de type III. L'analyse de la quantité de cette protéine par Western blot montre que malgré le fait qu'il y ait 14% en plus de GFAP dans le cerveau des souris $S^{-/-}$, cette différence demeure non significative (figure 32Bb : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de GFAP : 1,14 ; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5).

Les progéniteurs d'oligodendrocytes constituent jusqu'à 5% de la population cellulaire du cerveau. Expriment le protéoglycane chondroïtine sulfate à leur surface, reconnu par l'anticorps anti-NG2, elles sont plus couramment nommées cellules NG2, sinantocytes ou encore OPC (*Oligodendrocyte Progenitor Cells*). Les cellules NG2 sont considérées comme la source principale (précurseurs) d'oligodendrocytes myélinisants au cours du développement cérébral et lors des processus de démyélinisation lésionnelle chez l'adulte. L'étude de la quantification de la protéine NG2 dans les cerveaux de souris $S^{-/-}$ et $S^{+/+}$ montre que le taux de NG2 diminue de 21% chez les souris $S^{-/-}$ (figure 32Bb : Ratio protéique $S^{-/-}$ par

rapport à $S^{+/+}$ de NG2 : 0,79 ; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5). Cependant, cette diminution n'est pas significative.

De plus, nous avons analysé les quantités de MBP, PLP et CNPase, trois constituants majeurs de la myéline du SNC, certains étant aussi impliqués dans la maturation précoce des oligodendrocytes. La CNPase est une phosphodiesterase associée à la myéline et représente 4% de la totalité des protéines myéliniques du SNC (Sakamoto et al., 2005; Kursula, 2008). Son expression par les oligodendrocytes du SNC caractérise un des stades les plus précoces de leur différenciation (Gravel et al., 1996). Elle semble aussi jouer un rôle prépondérant dans les phases précoces du processus de myélinisation (Bifulco et al., 2002). La CNPase est aussi connue pour sa capacité à s'associer aux microtubules et son rôle similaire aux MAPs (potentialiser la formation des microtubules à basse concentration). L'expression de la CNPase est fortement altérée puisque sa quantité est réduite significativement de 25% dans le cerveau des souris $S^{-/-}$ (figure 32Bb : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de CNPase : 0,75, $p < 0,01$; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5).

La MBP (Myelin Basic Protein), protéine soluble et fortement chargée, est connue pour son rôle majeur dans le processus de myélinisation des tracts neuronaux du SNC et son association à la sclérose en plaque. Le pool de MBP dans le SNC est très divers de part ses nombreuses isoformes ainsi que l'importante variété de modifications post-traductionnelles qu'elles peuvent subir (phosphorylation, méthylation, deamidation, citrullination). De part son interaction avec PLP -une autre protéine myélinique dont nous discuterons dans le paragraphe suivant-, la protéine MBP joue un rôle dans la stabilisation des interactions entre les feuillettes lipidiques intracellulaires des membranes myéliniques (Edwards et al., 1989). L'analyse de la quantité de MBP dans les cerveaux de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ montre que son taux est diminué de 33% chez les $S^{-/-}$ (figure 32Bb : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de MBP : 0,67, $p < 0,01$; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5). Ainsi, les résultats obtenus pour la CNPase et la MBP confirment la première impression obtenue grâce à NG2.

La PLP (ProtéoLipid Protein) est une protéine associée à la maladie de Pelizaeus-Merzbacher. C'est une protéine à 4 domaines transmembranaires dont le côté extracellulaire a une très forte affinité pour ses autres copies. La PLP est la protéine prédominante de la myéline du SNC et joue ainsi un rôle dans la compaction, la stabilisation et la maintenance des feuillettes de myéline entre eux. Indirectement, PLP joue donc un rôle dans le développement et la survie axonale. En effet, la myélinisation axonale est un processus qui se déroule en aval de la maturation axonale. L'analyse protéique des cerveaux de souris $S^{-/-}$ et à $S^{+/+}$ montre que la quantité de PLP augmente fortement chez les $S^{-/-}$ (24% : figure 32Bb : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de PLP : 1,24, $p < 0,01$; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5).

Nous remarquons que sur trois marqueurs myéliniques, deux diminuent très significativement alors que le troisième, PLP, lui augmente. Ceci dénote un réel déséquilibre dans les constituants myéliniques majeurs que sont PLP et MBP. De tels déséquilibres sont retrouvés chez les souris surexprimant PLP et présentant une dysmyélinisation (mise en place des feuilletts myéliniques). Cette dysmyélinisation est corrélée à un déficit du renouvellement de la PLP accompagnée d'une sous expression de MBP (Karim et al., 2010). Les diminutions significatives de CNPase, MBP pourraient aussi traduire une perte importante de substance blanche.

- **Marqueurs neuronaux**

La diminution de certains marqueurs du compartiment myélinique nous a poussés à analyser l'intégrité de la population neuronale ainsi que celle du neuropil (axone et dendrite). En effet, nous voulons savoir si l'altération du compartiment myélinique était associée à une altération du neuropil dont l'intégrité est fortement corrélée à celle de la myéline. Nous avons vu, par ailleurs, que le neuropil et la gaine de myéline des tracts neuronaux cérébraux étaient fortement réduits dans le cerveau des patients schizophrènes (voir introduction, chapitre « symptomatologie cérébrale et intégrative de la schizophrénie »).

Marqueurs neuronaux

Nous avons tout d'abord quantifié des marqueurs cytosquelettiques et cytoplasmiques neuronaux comme la β III tubuline, NSE (Neuronal Specific Enolase), et NeuN (Neuronal specific Nuclear protein). Ces trois marqueurs neuronaux ne varient pas significativement entre les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ (figure 32Cb : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de β III tubuline : 0,86 ; Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de NSE : 1,01 ; Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de NeuN : 1,05 ; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5). Ces résultats suggèrent que la quantité de neurones ne varie pas mais qu'il pourrait y avoir une différence dans la morphologie des neurones chez les souris $S^{-/-}$. En effet, si nous regardons les marqueurs NeuN et NSE, qui sont nucléaires et cytoplasmiques, ils ne semblent pas sous exprimés. Au contraire le taux de ces protéines reste équivalent à celui des souris sauvages. Par contre, la quantité de β III tubuline, elle, suit la diminution moyenne des protéines $S^{-/-}$. Malgré le fait que l'hypothétique diminution de β III tubuline ne peut être encore ni confirmée, ni infirmée, il semblerait que ce soit plus une réduction du nombre ou de la taille des prolongements neuronaux qui soit à l'origine de la diminution de tubuline qu'un nombre réduit de corps cellulaires neuronaux. Les corps cellulaires des neurones semblent plus donc gros et les prolongements moins branchés, plus fins ou moins longs. Pour répondre à cette question, nous avons ensuite analysé la quantité protéique de différents marqueurs spécifiques d'axones, de dendrites et de synapses.

Marqueurs neuritiques

Les neurites font partie du compartiment du neuropil regroupant à la fois les prolongements neuronaux, axones et dendrites, et les prolongements astrocytaires.

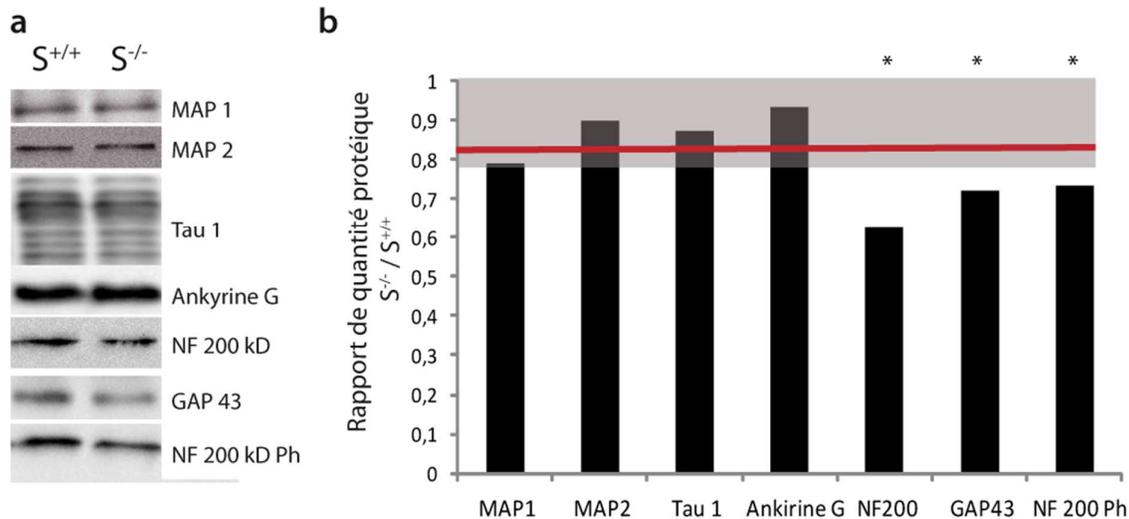
Nous nous sommes intéressés en premier lieu aux quantités de MAPs neuronales, MAP1 et MAP2. Nous avons décrit le rôle des MAPs précédemment dans l'introduction (voir introduction, chapitre 2.2.1). Ces protéines sont essentiellement dendritiques, seul MAP1 est capable de se retrouver aussi dans les axones. L'analyse des quantités de ces protéines dans le cerveau de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ montrent qu'il n'y a pas de différence significative dans le taux d'expression de ces deux marqueurs (figure 33Db : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de MAP1 : 0,78 ; ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de MAP2 : 0,89 ; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5). Ces premiers éléments nous ont amenés à approfondir l'étude de protéines axonales. Nous avons alors analysé la quantité de Tau 1, protéine microtubulaire dont nous avons aussi détaillé le rôle dans l'introduction. La quantité protéique des isoformes de Tau 1 semblent diminuer de 13% (figure 33Db : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de Tau 1 : 0,87, $p > 0,01$; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5) et suit parfaitement la diminution globale de la quantité protéique du cerveau des souris $S^{-/-}$. Cette diminution n'est cependant pas significative.

Au niveau des neurofilaments, nous avons analysé la quantité de la forme 200 kD (NF 200 kD) qui est autant dendritique qu'axonale et la forme phosphorillée de NF 200 kD (NF 200 kD ph), spécifiquement axonale. Nous pouvons observer que les quantités des deux formes sont significativement réduites chez les souris $S^{-/-}$ (figure 33Db : Ratios protéiques $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de NF 200 kD : 0,62, $p < 0,01$; NF 200 kD ph : 0,73, $p < 0,01$; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5). Nous avons analysé la quantité d'une autre protéine spécifique de l'axone, GAP 43 (*Growth Associated Protein*). Cette protéine est fortement associée à la croissance axonale et à la plasticité synaptique puisqu'elle est exprimée à des taux élevés dans les cônes de croissance durant le développement et la régénération axonale.

Au niveau de la terminaison présynaptique, GAP 43 interagirait avec de nombreuses protéines (dont Tau et Synaptophysine) et serait donc une protéine adaptatrice régulant les fonctions présynaptiques comme la communication bidirectionnelle entre le compartiment pré et postsynaptique. Cette protéine diminue de 29% dans le cerveau des souris $S^{-/-}$ (figure 33Db : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de GAP 43 : 0,71, $p < 0,01$; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5). Afin de savoir si la diminution des quantités de marqueurs axonaux était due à une diminution du nombre de neurones ou une absence d'axones dans certains neurones, nous avons analysé la quantité d'un élément proximal des axones, l'Ankyrine G. Cette protéine se situe au début de l'axone, c'est-à-dire dans son segment initial. Notre analyse protéique montre qu'il n'y a aucune différence significative dans la quantité d'Ankyrine G dans le

cerveau des souris $S^{-/-}$ et $S^{+/+}$ (figure 33Db : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ d'Ankyrine G : 0,93 ; $S^{+/+}$ n = 5, $S^{-/-}$ n = 5).

D Marqueurs neuritiques



E Marqueurs synaptiques

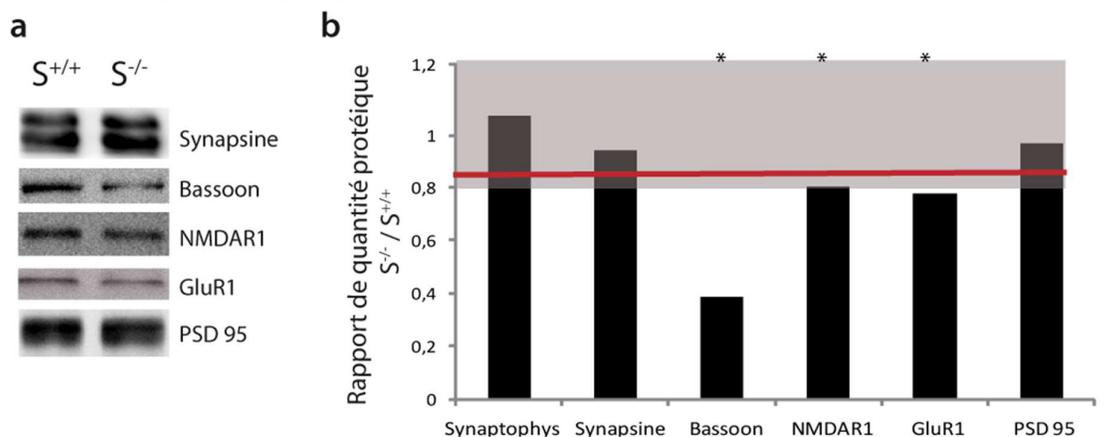


Figure 33 : Quantification par Western Blot de marqueurs neuronaux neuritiques et synaptiques contenus dans les cerveaux de souris $S^{+/+}$, $S^{-/-}$. Partie 2.

D : Analyse quantitative du contenu protéique cérébral en marqueurs neuritiques neuronaux : *MAP 1*, *MAP 2*, *Tau 1*, *Ankyrine G*, *NF 200 kD*, *GAP43* et *NF 200 kD phosphorillé*. **E :** Analyse quantitative du contenu protéique cérébral en marqueurs synaptiques : *Synaptophysine*, *Synapsine*, *Bassoon*, *NMDAR 1*, *GluR 1* et *PSD95*. Pour **D** et **E**, **a** : photographie représentative des bandes protéiques de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ spécifiques de chaque marqueur analysé, révélées à l'aide d'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) spécifique de l'anticorps primaire, par Western Blot. **b** : Histogramme représentatif des moyennes des ratios des quantités protéiques de chaque marqueur analysé de souris $S^{-/-}$ par rapport aux souris $S^{+/+}$ ($S^{-/-}/S^{+/+}$). Le trait rouge indique le ratio 0.87 correspondant à la moyenne générale des ratios $S^{-/-}/S^{+/+}$. Les limites des zones gris foncé correspondent à un intervalle de confiance au risque 1% à l'intérieur duquel les quantités protéiques sont identiques dans les deux génotypes ($S^{+/+}$ et $S^{-/-}$). Nombre d'animaux utilisés : $S^{+/+}$ n=5, $S^{-/-}$ n=5.

Ces résultats plaident en faveur d'une altération du compartiment axonal assez importante dans le cerveau des souris $S^{-/-}$ puisque la plupart des marqueurs axonaux se trouvent diminués dont certains très spécifiques, comme les GAP43, NF 200 et NF 200 phosphorylé. Le fait que l'Ankyrine G, se situant au niveau des segments initiaux des axones, ne diminue pas chez les $S^{-/-}$ écarte l'hypothèse d'une diminution du nombre d'axones. Les résultats obtenus suggèrent qu'il y aurait plutôt une diminution du diamètre, de la longueur ou bien des embranchements axonaux. Nous observons une corrélation significative entre l'altération du compartiment axonal et la réduction de la plupart des marqueurs myéliniques.

Marqueurs pré et postsynaptiques

Vu que l'intégrité des synapses dépend directement de la bonne maturation et formation axonales, nous avons décidé d'analyser certains marqueurs synaptiques. La Synaptophysine et la Synapsine sont toutes les deux des protéines présynaptiques associées aux vésicules présynaptiques et jouent un rôle dans l'arrivée des vésicules dans le bouton synaptique ainsi que la fusion des membranes vésiculaire et synaptique permettant le relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Il n'y a aucune différence significative entre les souris $S^{-/-}$ et $S^{+/+}$ dans la quantité de ces deux protéines (figure 33Eb : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de Synapsine : 0,94, $p > 0,01$; Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de Synaptophysine : 1,07 ; $S^{+/+}$ $n = 5$, $S^{-/-}$ $n = 5$).

Bassoon est une protéine spécifiquement localisée dans la zone active des terminaisons présynaptiques et interagit fortement avec la protéine Piccolo, la chaîne légère de la Dynéine et contient des domaines de liaison aux MTs. Elle est impliquée dans l'organisation structurale du bouton présynaptique et plus précisément de la zone de relargage des neurotransmetteurs (élément majeur de la cytomatrice). Bassoon est exprimée massivement dans la zone présynaptique du neuropile de neurones excitateurs et inhibiteurs de l'hippocampe, du bulbe olfactif ainsi que du cervelet. La quantité de Bassoon dans le cerveau des souris $S^{-/-}$ est fortement diminuée (62%, figure 33Eb : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de Bassoon : 0,38, $p < 0,01$; $S^{+/+}$ $n = 5$, $S^{-/-}$ $n = 5$). Le fait que Bassoon diminue drastiquement pourrait provenir soit d'une diminution importante du nombre de synapses dans le cerveau des souris $S^{-/-}$, notamment au niveau de l'hippocampe, du cervelet et du bulbe olfactif où la protéine est fortement concentrée, soit d'une réduction de la taille des synapses. Les résultats de quantifications de marqueurs présynaptiques suggèrent qu'il pourrait y avoir une déficience dans l'architecture présynaptique, plus qu'un défaut du contenu présynaptique.

Nous avons aussi analysé la quantité de PSD 95 (*Post Synaptic Density protein 95 kDa*), une protéine postsynaptique présente à la fois dans les épines dendritiques mais aussi dans les parties postsynaptiques présentes sur les dendrites (rafts dendritiques). L'analyse de la quantité de cette protéine dans les cerveaux $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les deux génotypes (figure 33Eb : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de PSD 95 : 0,96, $p > 0,01$; $S^{+/+}$ $n = 5$, $S^{-/-}$ $n = 5$). Nous nous sommes intéressés ensuite à deux récepteurs glutamatergiques, les récepteurs NMDA et AMPA. Sachant que la souris $S^{-/-}$ présente une hypoglutamatergie associée à une réduction des pools vésiculaires au sein de l'hippocampe (Andrieux et al., 2002), il nous a semblé judicieux de regarder en premier lieu le contenu du cerveau des souris $S^{-/-}$ en sous-unités des récepteurs glutamatergiques. Nous avons ainsi analysé la quantité d'une de leur sous-unités principales (NR_1 pour le récepteur NMDA et $GluR_1$ pour le récepteur AMPA). Nous pouvons donc observer que les taux de NR_1 et $GluR_1$ sont réduits de 20 et 23% spécifiquement (figure 33Eb : Ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de NR_1 : 0,80, $p > 0,01$; ratio protéique $S^{-/-}$ par rapport à $S^{+/+}$ de $GluR_1$: 0,77, $p > 0,01$ $S^{+/+}$ $n = 5$, $S^{-/-}$ $n = 5$). Ces résultats suggèrent que le compartiment post-synaptique pourrait être affecté chez les souris $S^{-/-}$.

- **Conclusion**

Cette étude globale en Western blot d'extraits totaux de cerveaux nous a permis de mettre en évidence d'importants déficits dans la quantité de certains marqueurs sub-cellulaires chez la souris $S^{-/-}$. Ces résultats suggèrent de façon générale que :

- La diminution du volume cérébral ne s'accompagne pas d'une perte cellulaire massive, en particulier du type neuronal.
- Les compartiments myéliniques et axonaux sont fortement diminués. En effet, nous avons une diminution de la quantité de certains marqueurs myéliniques corrélant parfaitement avec des réductions des quantités de marqueurs axonaux et synaptiques.
- L'étude a été effectuée aussi sur des animaux hétérozygotes ($S^{+/-}$) et quelque soit le marqueur, aucune réduction significative n'a été décelé chez ces souris.

Plusieurs questions se posent alors. Est-ce que les axones $S^{-/-}$ sont moins longs, plus fins, moins branchés ou bien il y a-t-il moins d'axones dans les tracts ? Est-ce que la baisse importante des marqueurs myéliniques se traduit par une perte de substance blanche ? Traduit elle un défaut de myélinisation (gaine de myéline plus fine) ? Ou bien découle-t-elle de la diminution du compartiment axonal

4.1.2 Analyse histologique des tracts myélinisés du cerveau des souris $S^{-/-}$

L'analyse des marqueurs suggère une perte de substance blanche dans le cerveau des souris $S^{-/-}$. Ces résultats nous ont poussés à étudier alors l'intégrité des tracts neuronaux et plus particulièrement les tracts myélinisés. Nous savons par ailleurs que la surface des tracts myélinisés est fortement réduite dans le cerveau des patients humains schizophrènes. Nous voulons donc savoir si la souris $S^{-/-}$ présenterait des phénotypes équivalents au niveau de la surface des tracts axonaux.

4.1.2.1 Mise en évidence des tracts myélinisés

Des études IRM ont démontré que plusieurs structures du système limbique sont atteintes dans la schizophrénie (M.E.Shenton et al, 2001). Or, la protéine STOP est fortement exprimée dans plusieurs structures cérébrales appartenant au système limbique (Couegnas et al). Ce dernier était initialement décrit comme le siège des émotions. Pour notre étude, il est défini anatomiquement comme décrit dans la figure 34. Actuellement, les connaissances sur sa fonction se sont élargies et il a également un rôle dans l'apprentissage, l'olfaction et les mécanismes de récompense. Le système limbique joue, par ailleurs, un rôle primordial dans la mémoire à long terme. Le système limbique peut être aussi représenté par le «Circuit de Papez», qui désigne un ensemble de connexions entre l'hippocampe, les corps mamillaires et le thalamus. Ce circuit est un acteur-clé dans la formation des souvenirs.

Du fait de la différence de taille entre les cerveaux $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$, nous avons dû sélectionner, pour cette première approche histologique, des coupes coronales en fonction de repères anatomiques bien précis (Figure 28) afin d'analyser l'intégrité de tracts limbiques. Tous ces tracts font partie de la substance blanche et sont constitués d'axones myélinisés. Nous avons aussi étudié l'intégrité de deux grosses commissures très représentatives de la substance blanche dans le SNC : le corps calleux et la commissure antérieure. Les structures myéliniques ont été mises en évidence par le bleu luxol et les corps cellulaires de neurones seront colorés par le violet crésyl.

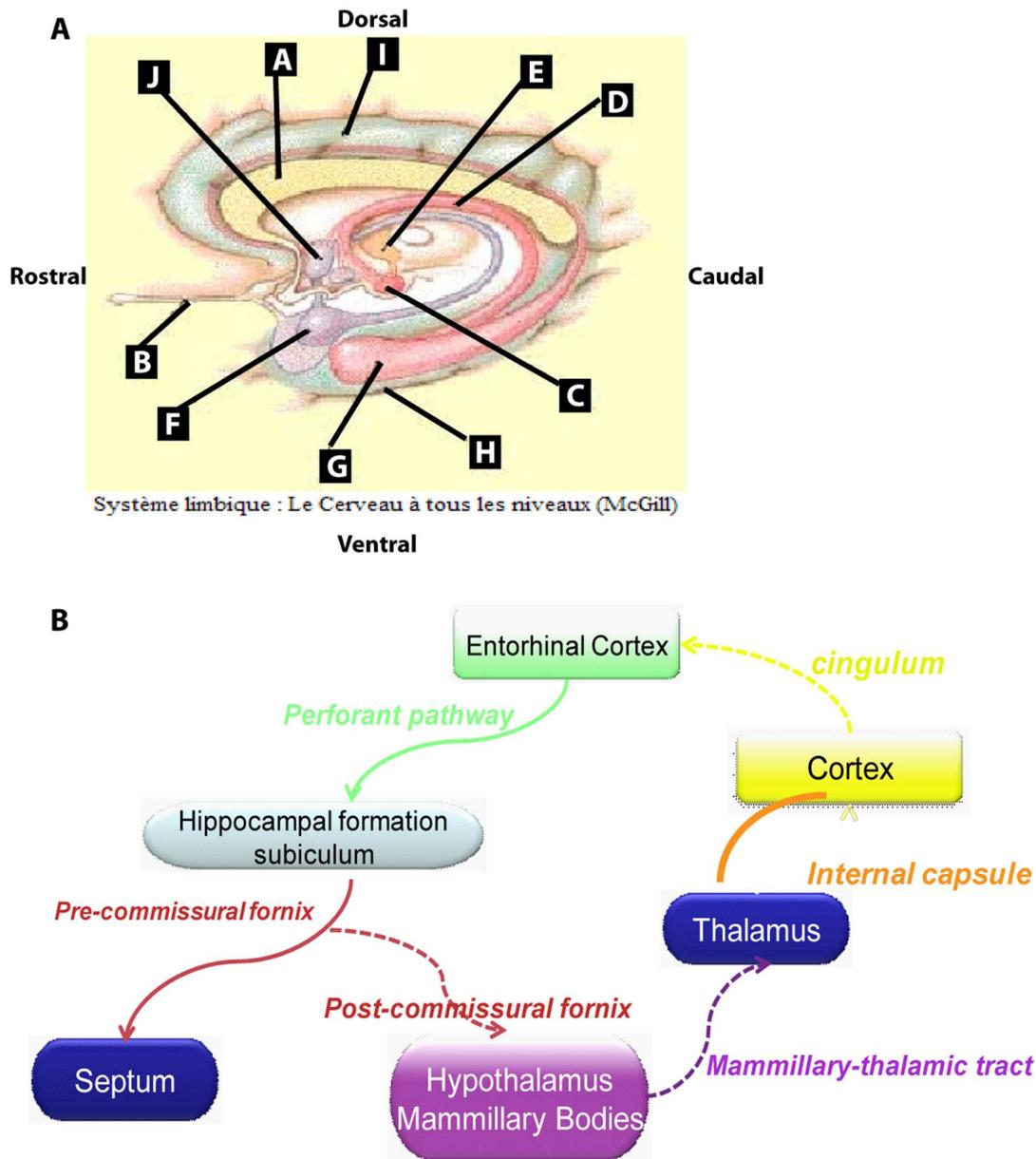


Figure 34 : Schémas représentatifs du système limbique humain.

A : représentation schématique du système limbique humain. **B** : représentation schématique du circuit de Papez, circuit faisant parti du système limbique.

A - Corps calleux, B - Voie olfactive, C - Corps mamillaires, D – Fornix, E - Noyaux antérieurs du thalamus, F – Amygdale, G – Hippocampe, H - Gyrus parahippocampique, I - Circonvolution cingulaire, J - Noyaux hypothalamiques

4.1.2.2 Etude histologique de la surface du corps calleux

Le corps calleux est la commissure la plus importante du cerveau, elle assure le transfert interhémisphérique des informations. Dans le cerveau des mammifères, le corps calleux forme la majeure partie de la substance blanche. Nous avons regardé si le corps calleux des souris $S^{-/-}$ (figure 35F, en jaune) présentait une différence de taille par rapport à

celui des $S^{+/+}$ (figure 35E, en jaune). Pour cela, nous avons mesuré la largeur du corps calleux en son centre (genou du corps calleux) et, de chaque côté, nous avons mesuré le corps calleux et le cingulum (figure 35A, coupe coronale a). Ces résultats démontrent parfaitement que le corps calleux des souris $S^{-/-}$ est significativement plus petit (figure 35M). Le genoux du corps calleux est réduit de 21% chez les souris $S^{-/-}$ comparé au souris $S^{+/+}$ ($S^{+/+}$: 0,56 mm, n = 5 ; $S^{-/-}$: 0,44 mm, n = 6 ; p < 0,001), ainsi que le corps calleux et le cingulum, réduits de 17% chez les souris $S^{-/-}$ ($S^{+/+}$: 0,53 mm, n = 5 ; $S^{-/-}$: 0,44 mm, n = 6 ; p < 0,01).

4.1.2.3 Etude histologique de la surface de la commissure antérieure

Après avoir analysé la structure du corps calleux, nous avons poursuivi notre étude en regardant la commissure antérieure (coupe coronale a, figure 35A) qui est elle aussi principalement composée de substance blanche. Elle relie les 2 hémisphères du cerveau. La commissure antérieure est présente chez les souris $S^{-/-}$ et $S^{+/+}$ et elle ne subit aucune modification de surface (figures 35E et 35F, fléché en vert). Les mesures de surface obtenues proviennent de la moyenne de la surface de la commissure antérieure droite et gauche pour chaque animal. ($S^{+/+}$: 0,174 mm², n = 5 ; $S^{-/-}$: 0,163 mm², n = 6 ; p = 0,5) (figure 35M).

4.1.2.4 Etude histologique de la surface de la partie post-commissurale du fornix

Le fornix (f) est une commissure intra-hémisphérique du cerveau. Il caractérise essentiellement les afférences principales de l'hippocampe qui vont connecter les corps mamillaires. Le fornix est composé d'une partie pré-commissurale et d'une partie post-commissurale (voir paragraphe suivant). Sur les coupes b, c et d (figures 35B, 35C et 35D), nous pouvons observer la partie post-commissurale du fornix. La totalité du fornix sera plus amplement étudiée dans le prochain paragraphe. Les colorations histologiques montrent que quel que soit le niveau de coupe analysé, la partie post-commissurale du fornix est absente chez les animaux $S^{-/-}$ (figures 35H, 35J et 35L).

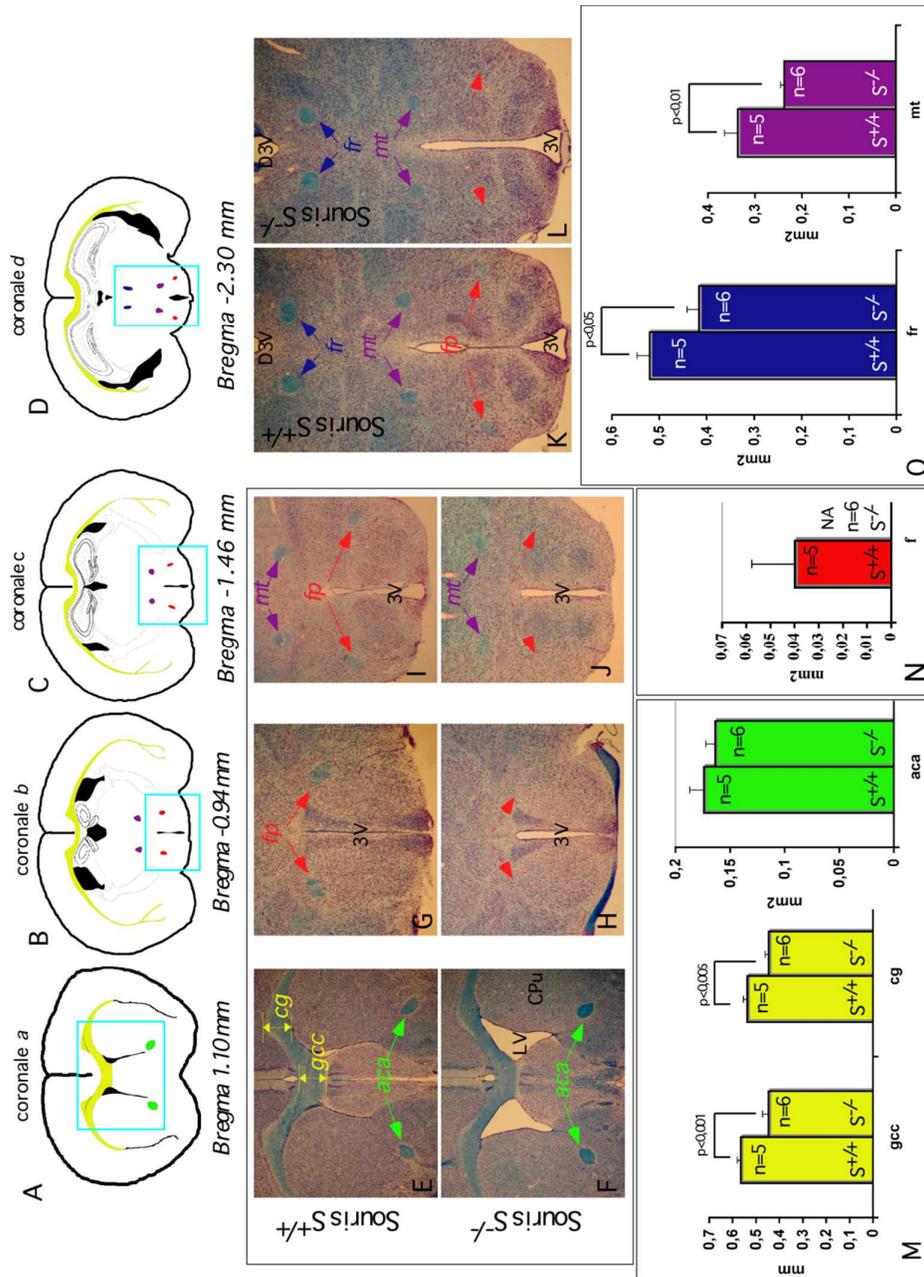


Figure 35 : Différences anatomiques et morphométriques entre souris sauvages (S^{+/+}) et invalidées (S^{-/-})

A - D : représentations anatomiques schématisés des coupes coronales sélectionnées pour les colorations au bleu de Luxol. Le corps calleux (cc) et le cingulum (cg) sont représentés en jaune, le fornix (f) en rouge, les commissures antérieures en vert (aca), les faisceaux mamillo-thalamiques (mt) en violet et le faisceau rétroflexe (fr) en bleu. Les carrés bleus indiquent la position des champs photographiques des coupes coronales des souris S^{+/+} (**E, G, I et K**) et S^{-/-} (**F, H, J et L**). Le bleu de luxol colore les faisceaux nerveux en bleu et le crésyl violet les corps cellulaires des neurones en violet. Les principales structures cérébrales sont indiquées selon leur abréviation. En **G, H, I, J, K et L**, l'absence du fornix est indiquée par une flèche pointillée rouge. **O**, histogramme de la moyenne des surfaces du faisceau rétroflexe et du faisceau mamillo-thalamique chez les souris S^{+/+} et S^{-/-}. Ces mesures ont été effectuées sur la coupe coronale d. En **M**, histogramme de la moyenne de l'épaisseur du genou du corps calleux (cgg), du cingulum (cg) et des commissures antérieures (aca) chez les souris S^{+/+} et S^{-/-}. Ces mesures ont été effectuées sur les coupes coronales a. L'épaisseur du gcc et du cg mesurée est indiquée en **E** (doubles flèches jaunes). **N** : histogramme de la moyenne de la surface du fornix chez les souris S^{+/+} et S^{-/-}. Les mesures ont été effectuées sur les coupes coronales c. N.A : non applicable.

4.1.2.5 Etude histologique de la surface du faisceau mamillo-thalamique

Le faisceau mamillo-thalamique (*mt*) constitue la voie efférente reliant le corps mamillaire au thalamus. Ce faisceau apparaît sur la coupe coronale *c* (figure 35C, indiqué en violet) mais est clairement visible au niveau de la coupe coronale *d* (figure 35D, indiqué en violet). Contrairement au fornix, le faisceau mamillo-thalamique est nettement visualisé par une coloration au luxol chez les souris $S^{-/-}$ (figure 35J, fléché en violet). Cependant la moyenne des surfaces de ce faisceau calculée à partir des coupes coronales *d* montre une diminution significative chez les souris $S^{-/-}$ de 29,3% (figure 35D), ($S^{+/+}$: 0,33 mm², n = 5 ; $S^{-/-}$: 0,23 mm², n = 6 ; p < 0,05). Les coupes obtenues sont des coupes flottantes. Par conséquent, l'hémisphère droit ne peut plus être distingué de l'hémisphère gauche. Les mesures de surface obtenues proviennent de la moyenne de la surface des faisceaux mamillo-thalamiques droit et gauche pour chaque animal.

4.1.2.6 Etude histologique de la surface du faisceau rétroflexe

Le faisceau rétroflexe (*fr*) est une des voies efférentes de l'habenula qui fait partie de l'épithalamus. Le faisceau rétroflexe apparaît au niveau de la coupe coronale *d* (figure 35D, représenté en bleu) et est facilement visible par coloration au luxol chez les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ (figures 35K et 35L, fléché en bleu). Au même titre que le faisceau mamillo-thalamique, la surface de celui-ci est significativement diminuée de 20% chez les souris $S^{-/-}$. Les mesures de surface obtenues proviennent de la moyenne de la surface du faisceau rétroflexe droit et gauche pour chaque animal obtenu à partir des coupes coronales. (figure 35O : $S^{+/+}$: 0,52 mm², n = 5 ; $S^{-/-}$: 0,41 mm², n = 6 ; p < 0,05).

4.1.2.7 Conclusion

Cette première approche histologique confirme que les souris $S^{-/-}$ souffrent d'une perte de substance blanche. Certains tracts comme la commissure antérieure ne sont pas affectés alors que d'autres, comme le tract mamillo-thalamique, le cingulum, le corps calleux, et enfin le faisceau rétroflexe sont affectés. Par ailleurs, la perte de substance blanche ne se limite pas au système limbique puisque le faisceau rétroflexe est lui aussi atteint. Le résultat majeur de cette étude, et inattendu, est l'absence totale de la partie post-commissurale du fornix.

4.1.3 Analyse histologique du fornix du cerveau des souris S^{-/-}

L'absence totale de la partie post-commissurale du fornix nous a amené à analyser l'intégralité de ce tract.

Le fornix (ou trigone) est voie intra-hémisphérique en forme de « C » et constitue une des voies de sortie majeure de la formation hippocampale. Ce tract est principalement composé des axones du subiculum, région adjacente à la CA1 qui fait partie intégrante de la formation hippocampale (voir paragraphe résultats 4.1.7) qui vont connecter le septum latéral, le noyau accumbens, l'hypothalamus antérieur ainsi que les corps mamillaires (hypothalamus postérieur) et aussi les noyaux thalamiques antérieur. C'est un composant important du système limbique. Il se compose de quatre parties principales (figures 36 a et b) :

I : Les deux fimbriae (droites et gauches) : faisceaux d'axones situés latéralement à l'hippocampe qui constituent les voies de sorties des fibres hippocampales (Subiculum et Corne d'Amon) tout au long de l'hippocampe.

II : Deux piliers postérieurs droit et gauche sortant de l'hippocampe afin de se réunir pour former, au niveau de la pré-commissure, le corps du fornix.

III : Le corps du fornix : portion horizontale (chez l'homme) ou verticale (chez le rongeur), plate et dense située entre le 3^e ventricule et le corps calleux.

IV : Deux colonnes antérieures droite et gauche qui se séparent au niveau de la commissure postérieure du fornix, descendent entre le 3^{ème} ventricule et la commissure antérieure postérieure (acp, Figure 36 b) et rejoignent ensuite les corps mamillaires droit et gauche.

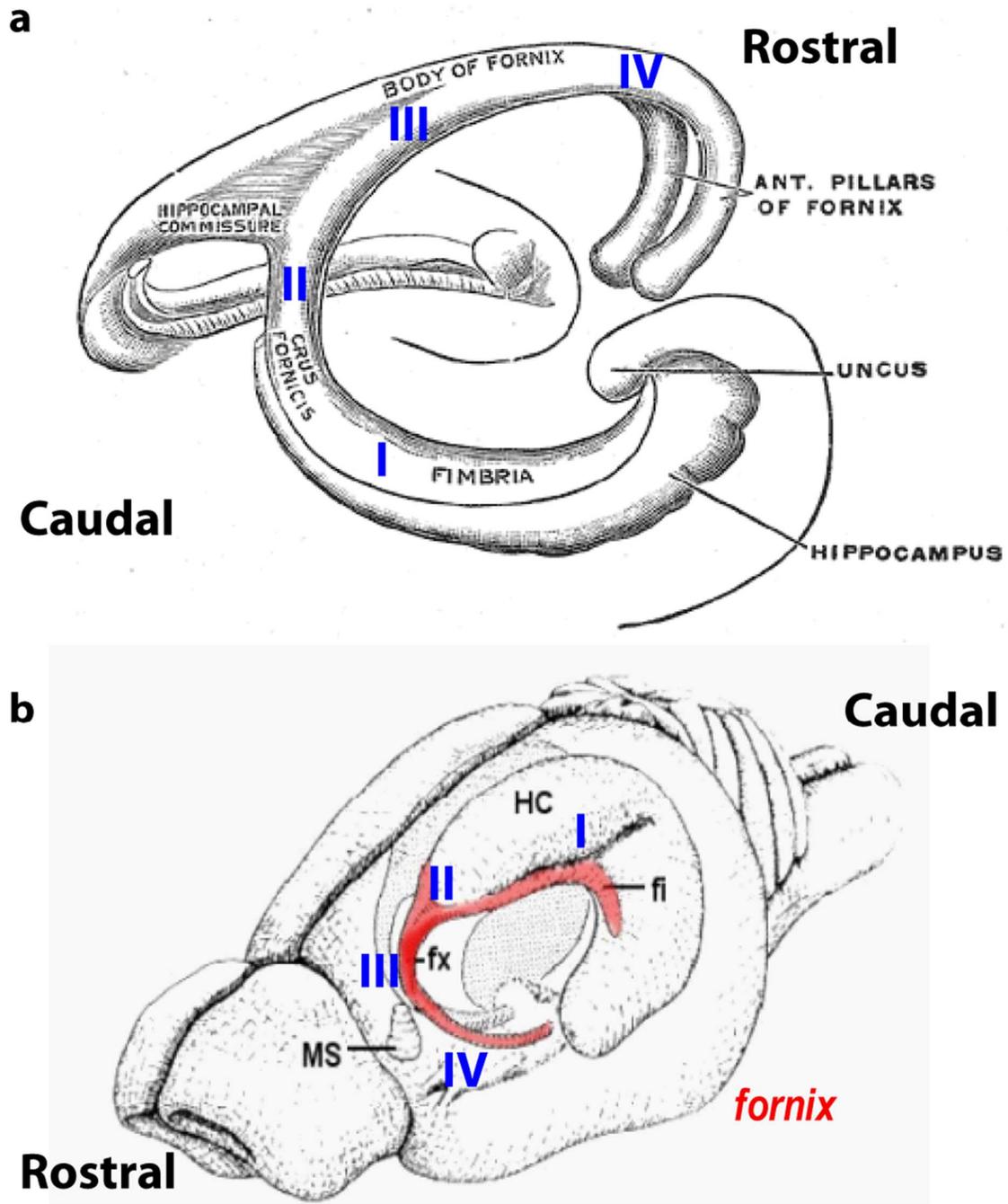


Figure 36 : Représentation picturale de la morphologie du fornix chez l'humain et le rongeur.
a : représentation spatiale du fornix chez l'homme. **b :** représentation spatiale du fornix chez le rongeur. **a et b :**
I : Les deux fimbriae, **II :** Deux piliers postérieurs droit et gauche, **III :** Le corps du fornix, **IV :** Deux colonnes
antérieures. *HC :* hippocampe, *fi :* fimbria, *fx :* fornix, *MS :* septum médian.

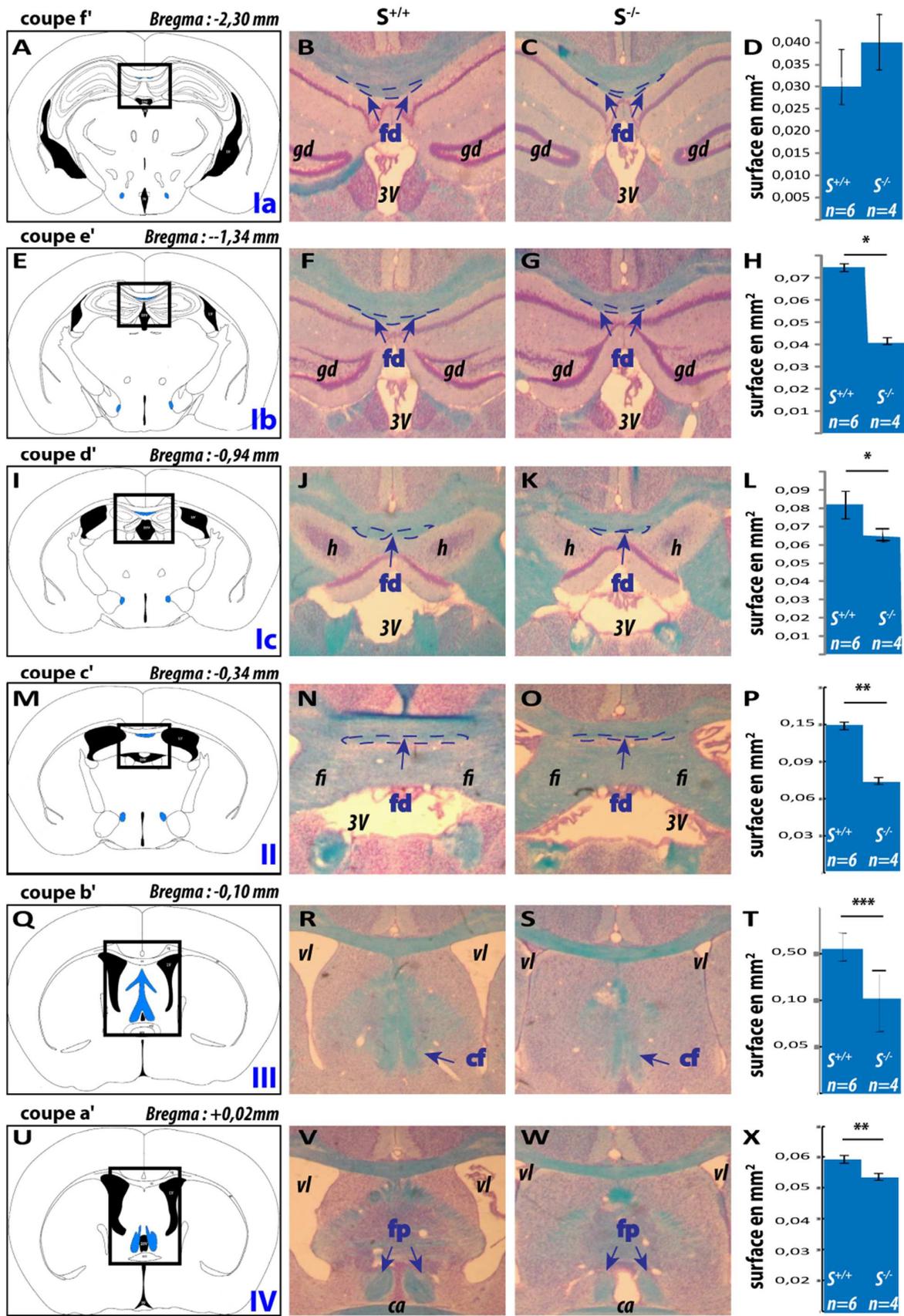


Figure 37 : Différences anatomiques et morphométriques du fornix dorsal, du corps du fornix et de la partie proximale du fornix post-commissural entre souris sauvages ($S^{+/+}$) et invalidées ($S^{-/-}$).

A, E, I, M, Q et U : représentations anatomiques schématisés des coupes coronales sélectionnées pour les colorations au bleu de Luxol. Le fornix dorsal (*fd*), le corps du fornix (*cf*) ainsi que le fornix post-commissural (*fp*) sont représentés en bleu. Les carrés noirs indiquent la position des champs photographiques équivalents aux coupes coronales des souris $S^{+/+}$ (**B, F, J, N, R et V**) et $S^{-/-}$ (**C, G, K, O, S et W**). Le bleu de Luxol colore les faisceaux nerveux en bleu et le crésyl violet les corps cellulaires des neurones en violet. Les principales structures cérébrales sont indiquées selon leur abréviation (voir liste page). Le fornix dorsal, post-commissural ainsi que le corps du fornix sont représentés par une flèche bleue. **D, H, L, P, T et X** : histogrammes de la moyenne des surfaces fornix chez les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ pour chaque coupe coronale et photographie correspondant. *Ia, Ib, Ic, II, III et IV* : équivalence anatomique des parties du fornix avec la figure 36.

Le fornix, de sa partie dorsale jusqu'à sa partie post-commissurale est visualisable tout au long des différents plans coronaux représentés dans la figure 37. Pour chaque plan de coupe, nous avons additionné la surface des fornix droits et gauches. La coloration au luxol permet de mesurer les surfaces de la partie du fornix dorsal (figures 37B, 37F, 37I et 37N, fléché en bleu ; $S^{+/+}$: 0,032 mm², 0,074 mm², 0,081 mm² et 0,15 mm², n = 6, figures 37D, 37H, 37L, 37P), du corps du fornix (figure 37R, représenté en bleu ; $S^{+/+}$: 0,58 mm², n = 6, figure 37T) et de la jonction proximale de sa partie post-commissurale chez les souris $S^{+/+}$ (figures 37V, fléché en rouge ; $S^{+/+}$: 0,14 mm², n = 5, figure 37X). Les mesures de surface du fornix chez les souris $S^{-/-}$ montrent qu'il est possible de visualiser le fornix sur tous les plans de coupe. En revanche, nous allons voir que la surface du fornix diminue progressivement de façon dorso-ventrale.

Au début de la formation du fornix (fornix dorsal), les fibres $S^{-/-}$ présentent une surface équivalente à celle des souris sauvages (figure 37C, fléché en bleu ; $S^{-/-}$: 0,040 mm², p > 0,5 n = 6, figure 37D). Des différences de surfaces significatives de la partie dorsale entre souris $S^{-/-}$ et $S^{+/+}$ apparaissent ensuite et cette diminution s'accroît jusqu'à 56 % au niveau du corps du fornix (figures 37G, 37K, 37O et 37S fléché en bleu ; figure 37H : $S^{-/-}$: 0,037 mm², p = 0,01 ; 37L : 0,061 mm², p < 0,05, 37P : 0,074 mm² et 37T : 0,26 mm², p < 5.10⁻⁵, n = 4). Lorsque les fibres se séparent à nouveau, leur surface diminue alors de 49% (figure 37W, fléché en bleu, $S^{-/-}$: 0,074 mm², p = 0,01, n = 4, figure 37X). Et comme nous l'avons vu précédemment, toute la partie post-commissurale disparaît (figures 35H, 35I et 35L). Ceci suggère que la disparition du fornix est très brutale après sa post-commissure.

4.1.4 Analyse de l'intégrité du fornix par traçage lipidique chez les souris KO STOP

Il semble, d'après notre étude histologique, sur des coupes coronales, que le fornix des souris $S^{-/-}$ disparaisse brusquement, juste après sa partie proximale post-commissurale. Afin de savoir si cela était dû à un défaut de myélinisation qui le rendrait indétectable au bleu luxol, nous avons décidé d'utiliser un traceur lipidique qu'est le Dil (carbocyanine) afin de visualiser l'ensemble du fornix, sans passer par une détection myélinique. En effet, le Dil est

une molécule fluorescente, qui, une fois son cristal implanté dans un tract neuronal de cerveau fixé, est capable de diffuser lentement (de façon antérograde et rétrograde) le long des lipides membranaires. Pour notre étude, une fois le cristal de Dil implanté dans le corps du fornix (figure 38Aa), 12 semaines d'incubation en PFA à 37°C ont été nécessaires pour qu'il diffuse tout au long du tract.

Il nous est impossible de visualiser sur une même coupe sagittale l'intégralité du fornix car il ne reste pas toujours dans le même plan. L'implantation du Dil dans le corps du fornix, va permettre, par diffusion rétrograde, le marquage du subiculum dorsal via l'alvéus aussi bien dans les souris $S^{+/+}$ que dans les souris $S^{-/-}$ (figures 38Ab et 38Ac). La diffusion antérograde du Dil permet de confirmer l'absence totale de la partie post-commissurale du fornix chez les souris $S^{-/-}$, indépendamment d'une coloration luxol (figure 38Ac). L'analyse détaillée de différents plans sagittaux nous a permis de mieux définir la zone de rupture du fornix chez les souris $S^{-/-}$. La comparaison des coupes sagittales de la figure 38Cd et g montre que la partie proximale du fornix post-commissural est bien présente mais fortement réduite chez les souris $S^{-/-}$. Les coupes sagittales de la figure 38Ce et h indiquent que le tract amorce bien sa ventralisation pour disparaître brutalement chez les souris $S^{-/-}$. Les coupes sagittales de la figure 38Cf et i confirment l'absence totale de la partie distale du fornix post-commissural chez les souris $S^{-/-}$.

La technique de traçage par le Dil confirme bien l'absence de la partie post-commissurale du fornix chez les souris $S^{-/-}$. Ce résultat nous permet aussi d'invalider l'hypothèse du défaut de myélinisation du tract qui le rendrait indétectable en histologie. Cependant nous ne pouvons pas affirmer qu'il n'y ait pas de défauts majeurs de myélinisation du fornix et des autres tracts chez les $S^{-/-}$.

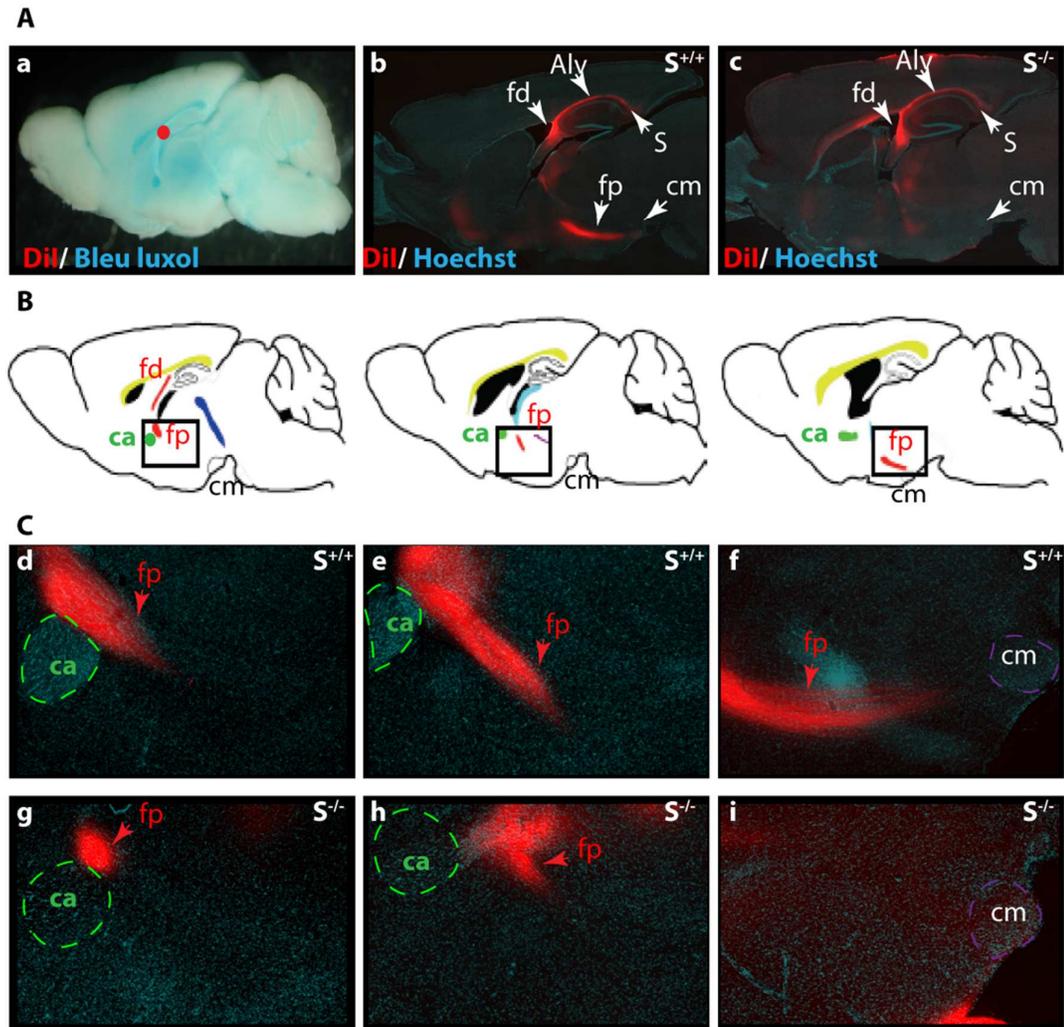


Figure 38 : Analyse morphologique du fornix entre souris sauvages ($S^{+/+}$) et invalidées ($S^{-/-}$).

A. a : illustration de l'implantation du cristal de DiI (point rouge) dans le corps du fornix afin de le visualiser dans son intégrité. Grâce à une coloration partielle au bleu luxol de la partie médiane de l'hémisphère cérébral, il est possible de discerner le fornix non coloré des autres tracts, par contraste, comme les commissures, qui sont coupées dans leur profondeur et donc colorées en bleu par le luxol. **b** : 12 semaines après implantation du cristal de DiI, visualisation en rouge, du subiculum (*S*), zone d'émergence des fibres formicales, du fornix dorsal (*fd*) et post-commissural (*fp*) ainsi que du corps mamillaire (*cm*), zone de projection du fornix, sur coupe sagittale de cerveau de souris $S^{+/+}$. **c** : 8 semaines après implantation du cristal de DiI, visualisation en rouge, du subiculum (*S*), zone d'émergence des fibres formicales, du fornix dorsal (*fd*) ainsi que du corps mamillaire (*cm*), zone de projection du fornix, sur coupe sagittale de cerveau de souris $S^{-/-}$. La partie post-commissurale du fornix (*fp*) est absente chez les souris $S^{-/-}$. **a et b** : Les coupes sont contre colorées au Hoechst. **B** : Représentation anatomique schématique des coupes sagittales sélectionnées pour notre étude d'après l'atlas « the Mouse Brain » de G.Paxinos. Le corps calleux est représenté en jaune, la commissure antérieure (*ca*) en vert, le fornix dorsal (*fd*) et post-commissural (*fp*) en rouge et le corps mamillaire (*cm*) en noir. Les carrés noirs indiquent la position des champs photographiques équivalents aux coupes sagittales des souris $S^{+/+}$ (**Cd**, **Ce** et **Cf**) et $S^{-/-}$ (**Cg**, **Ch** et **Ci**) utilisées pour l'analyse de la partie post-commissurale du fornix. *Aly* : alvéus.

4.1.5 Traçage du fornix par injection cérébrale stéréotaxique de lentivirus chez les souris KO STOP

De nos jours, il est possible de suivre l'intégralité d'un neurone dans un cerveau d'animal vivant par chirurgie stéréotaxique et injection d'un lentivirus codant pour la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Le lentivirus utilisé est le VIH (*Virus de l'Immunodéficience Humaine*) qui a été inactivé et rendu non répliatif, dont on a inséré la cassette du gène codant pour la GFP. Ce virus est maintenant capable d'infecter les neurones. Une fois injecté dans la structure d'intérêt, il va infecter les neurones environnants, sa rétrotranscriptase va ensuite traduire son ARN (*Acide RiboNucléotide*) en ADNc (*Acide DéoxyNucléotide codant*) afin que ce dernier puisse s'intégrer à l'ADN du neurone infecté. Tout neurone qui sera infecté exprimera la GFP de façon constitutive. La GFP elle, sera capable de diffuser le long de l'axone et des dendrites du neurone et nous permettra ainsi de visualiser la morphologie des axones constituant le fornix. Cette technique pourra aussi nous permettre de mieux appréhender le cheminement précis des axones post-commissuraux du fornix chez les souris $S^{-/-}$ et éventuellement de mettre en évidence des voies de projections anormales chez ces souris.

Nous avons choisi d'infecter la partie dorsale du subiculum, en effet, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, une grande majorité des neurones de cette partie projette leur axone dans le corps mamillaire via la partie post-commissurale du fornix (figures 34 et 43). Après 15 jours d'infection, nous avons fixé les souris et effectué des coupes sagittales de cerveau afin de visualiser l'ensemble du fornix, comme pour la précédente étude. Chez les souris $S^{+/+}$, les fibres (GFP⁺) du corps du fornix ont un aspect lisse, régulier et s'organisent parallèlement (figures 39Ba et d). En revanche, à ce même niveau, les fibres fornicales des souris $S^{-/-}$ arborent déjà un aspect différent : elles semblent beaucoup plus fines et le tract est moins organisé (figures 39Bg et j). L'aspect des fibres est moins lisse et plus irrégulier (figure 39Bj). Cet aspect granulaire et la désorganisation du tract s'accroissent au fur et à mesure de la ventralisation du fornix. Par ailleurs, nous pouvons voir apparaître de grosses varicosités dans les fibres de la partie proximale du fornix post-commissural chez les souris $S^{-/-}$ (figures 39Bh, i, k et l). A ce même niveau, les fibres des souris $S^{-/-}$ sont beaucoup moins nombreuses.

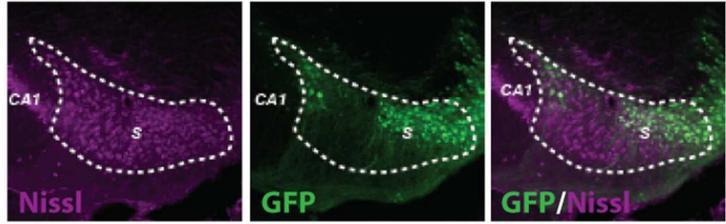
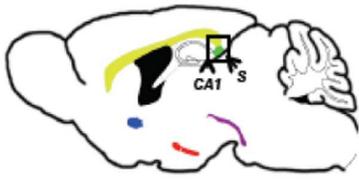
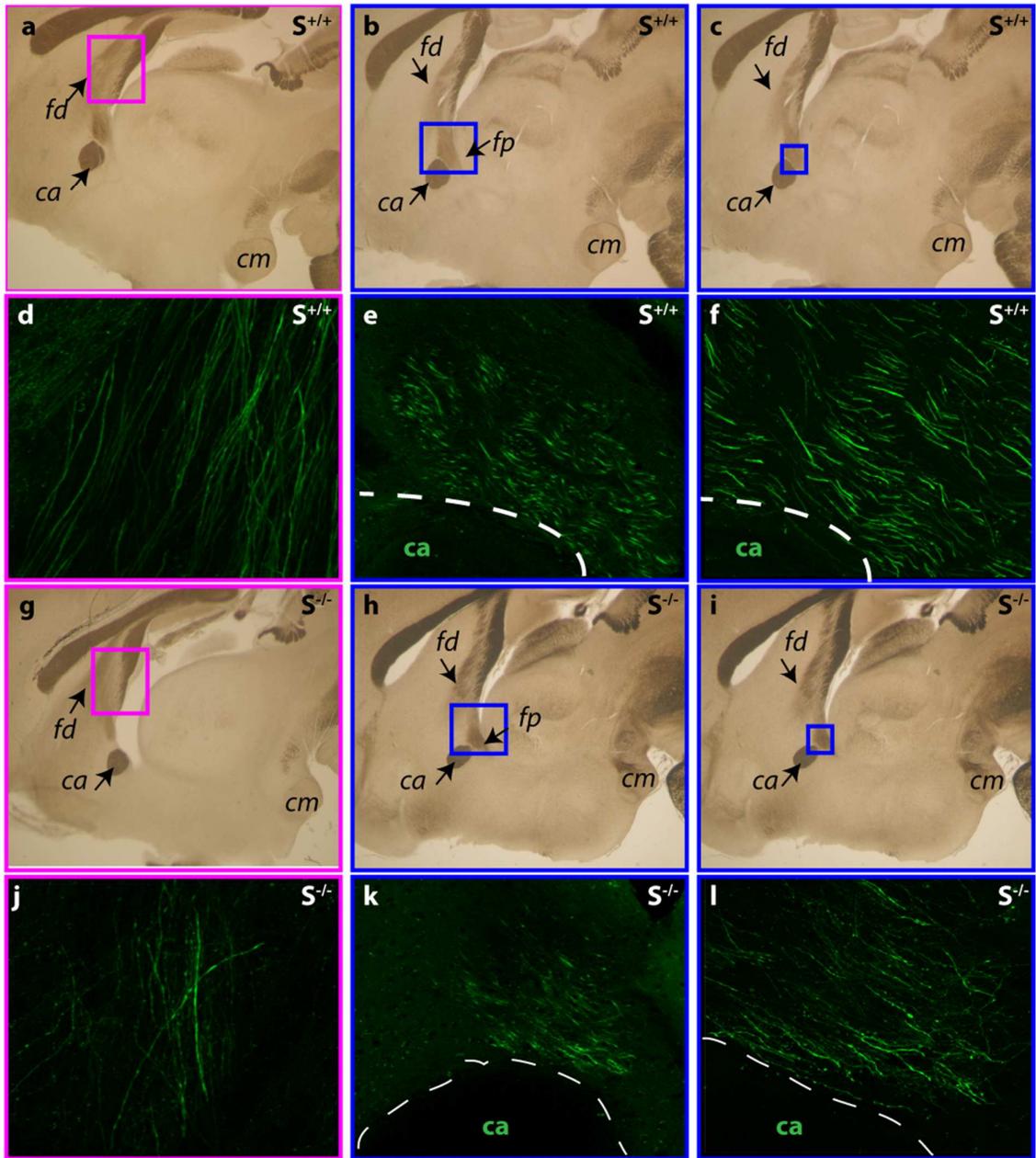
A**B**

Figure 39 : Etude morphologique des fibres axonales du fornix de souris sauvages ($S^{+/+}$) et invalidées ($S^{-/-}$) par traçage lentiviral. Partie 1.

A : gauche : Localisation schématique du site d'infection lentivirale stéréotaxique du subiculum (*S*) sur une coupe sagittale de cerveau. Le carré noir indique la position du champ photographique équivalent au site d'injection stéréotaxique du lentivirus codant pour la GFP. **Droite :** Mise en évidence du site d'infection du lentivirus codant pour la GFP dans le subiculum (*S*). Le Nissl met en évidence les corps cellulaires des neurones du subiculum. La GFP met en évidence les neurones infectés par le lentivirus. Les neurones du subiculum infectés par le lentivirus sont doublement marqués Nissl/GFP. **B :** Les carrés roses et bleus indiquent la position des champs photographiques équivalents aux coupes sagittales des souris $S^{+/+}$ (a, b, c et d, e, f) et $S^{-/-}$ (g, h, i et k, l, m) utilisées pour l'analyse des fibres du fornix dorsal (*fd*) et de la partie proximale du fornix post-commissural (*fp*), respectivement. **a, b, c :** Photographies des coupes sagittales de souris $S^{+/+}$ utilisées pour la visualisation des fibres vertes GFP⁺ du fornix. Les carrés roses et bleus indiquent la zone de visualisation des fibres observées au microscope confocal (d, e et f), grossissement x20. **g, h, i :** Photographies des coupes sagittales de souris $S^{-/-}$ utilisées pour la visualisation des fibres vertes GFP⁺ du fornix. Les carrés roses et bleus indiquent la zone de visualisation des fibres observées au microscope confocal (j, k et l), grossissement x20. **f :** Grossissement x2 de l'image b. **l :** Grossissement x2 de l'image k. *ac* : commissure antérieure, *cm* : corps mamillaires.

Lorsque les fibres du fornix post-commissural des souris $S^{+/+}$ commencent à se ventraliser (figure 40a), nous retrouvons l'aspect lisse et régulier de la partie dorsale. En revanche, la densité des fibres $S^{-/-}$ chute et seulement quelques très fines fibres arrivent à progresser (figure 40i). Ces fibres forment un éventail, comme si elles se défasciculaient pour se perdre dans la masse tissulaire. Toutefois, il est possible, sur deux cerveaux de souris $S^{-/-}$ de distinguer quelques rares fibres arriver au niveau du corps mamillaire (figure 40j). Chez les $S^{+/+}$ en revanche, un nombre de fibres plus important arrive sur le corps mamillaire (figure 40e). Si nous regardons au plus fort grossissement la zone d'arrivée des fibres du fornix sur le corps mamillaire des souris $S^{+/+}$ (figures 40e et f), nous retrouvons des varicosités équivalentes à celles observées chez les souris $S^{-/-}$ peu avant la zone où nous perdons la totalité des fibres (figures 39h, i, k et l). Nous pouvons penser que la présence de varicosités, à proximité des corps mamillaires, est le résultat d'une formation synaptique au niveau des dendrites des neurones du corps mamillaire. Ces varicosités correspondraient donc aux boutons synaptiques. Il est donc possible qu'une grande partie des axones du fornix des souris $S^{-/-}$ essaierait d'établir des connexions avec des neurones d'une région cérébrale adjacente à la partie proximale du fornix post-commissural, plutôt que d'aller connecter le corps mamillaire. Une autre interprétation de l'aspect granulaire des fibres du fornix des souris $S^{-/-}$ serait une dégénérescence axonale progressive. Par ailleurs, cette étude ne nous permet pas de déceler une autre voie de projection des fibres post-commissurales de fornix chez les souris $S^{-/-}$.

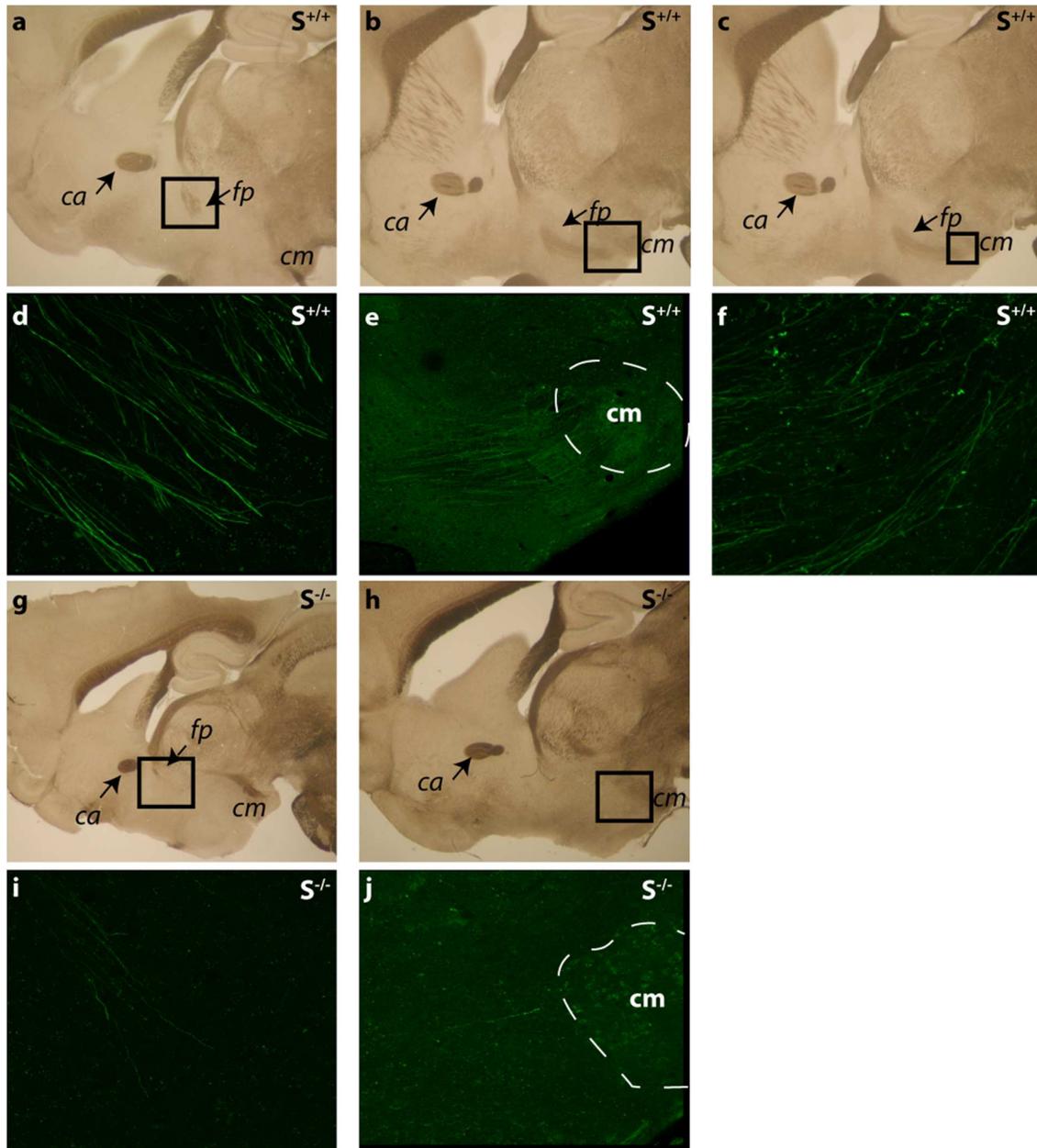


Figure 40 : Etude morphologique des fibres axonales du fornix de souris sauvages ($S^{+/+}$) et invalidées ($S^{-/-}$) par traçage lentiviral. Partie 2.

Les neurones du subiculum infectés par le lentivirus sont doublement marqués Nissl/GFP. Les carrés noirs indiquent la position des champs photographiques équivalents aux coupes sagittales des souris $S^{+/+}$ (a, b, c et d, e, f) et $S^{-/-}$ (g, h et i, j) utilisées pour l'analyse des fibres de la partie post-commissurale du fornix. **a, b, c :** Photographies des coupes sagittales de souris $S^{+/+}$ utilisées pour la visualisation des fibres vertes GFP^+ du fornix. Le carré noir indique la zone de visualisation des fibres observées au microscope confocal (d, e et f), grossissement x20. **g, h :** Photographies des coupes sagittales de souris $S^{-/-}$ utilisées pour la visualisation des fibres vertes GFP^+ du fornix. Le carré noir indique la zone de visualisation des fibres observées au microscope confocal (i, j), grossissement x20. **f :** Grossissement x2 de l'image e. *ca* : commissure antérieure, *cm* : corps mamillaire.

4.1.6 Analyse de l'intégrité des afférences des corps mamillaires par traçage lipidique des souris KO STOP

Notre étude de traçage lentiviral du fornix chez les souris $S^{-/-}$ montre que quelques fibres arrivent quand même jusqu'aux corps mamillaires. Afin de confirmer ce résultat, nous avons décidé d'implanter des cristaux de Dil dans les corps mamillaires de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$. Le colorant lipidique utilisé diffuse antérogradement pour les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ dans le noyau thalamique antérieur, via le tract mamillo-thalamique (figures 41Cb et d). La diffusion rétrograde nous permet de mettre en évidence la présence d'un faible marquage au niveau de la partie proximale du fornix post-commissural chez les souris $S^{-/-}$, attestant la présence d'une faible connexion entre le subiculum dorsal et les corps mamillaires (figure 41Cc).

4.1.7 Analyse histologique du subiculum dorsal distal chez les souris sauvages et KO STOP

Une grande majorité des axones constituant le fornix appartiennent aux neurones formant le subiculum. Cette structure corticale fait partie de la formation hippocampale comprenant aussi la corne d'Ammon (CA1, CA2 et CA3) ainsi que le gyrus denté (figure 42b). Comme le montre la figure 42, le subiculum tient une position centrale car il est directement relié aux structures para-hippocampales. De son côté proximal et sur l'axe septo-temporal, le subiculum connecte la CA1. Par son côté distal, il connecte le cortex rétrosplénial sur sa partie septale et le cortex entorhinal via le pré- et le parasubiculum sur sa partie temporale. Avec la CA1, le subiculum constitue la structure majeure de sortie de la formation hippocampale vers des structures sous corticales comprenant le septum latéral, le noyau accumbens, le noyau thalamique antérieur, l'hypothalamus antérieur et les corps mamillaires. Une très grande majorité de ces connexions se font via le fornix (figure 34). Malgré son apparence neuronale homogène (une seule couche de neurones pyramidaux, figure 42c), l'organisation topographique de ses éfférences sous-corticales suit un gradient septo-ventral et proximo-distal (figure 43) (Naber and Witter, 1998; Kishi et al., 2000; Wright et al., 2010). Nous avons cherché à savoir si l'absence de connectivité entre le subiculum et le corps mamillaire s'accompagnait d'une perte de neurones du subiculum. L'analyse histologique du subiculum reste complexe de part la difficulté à le distinguer des différentes régions para-hippocampales (par exemple le para et le pré-subiculum). Il est donc difficile d'analyser le subiculum dans sa globalité. Nous avons décidé, dans cette étude préliminaire, de nous focaliser sur la partie dorsale du subiculum. En effet, la majorité des neurones de cette région.

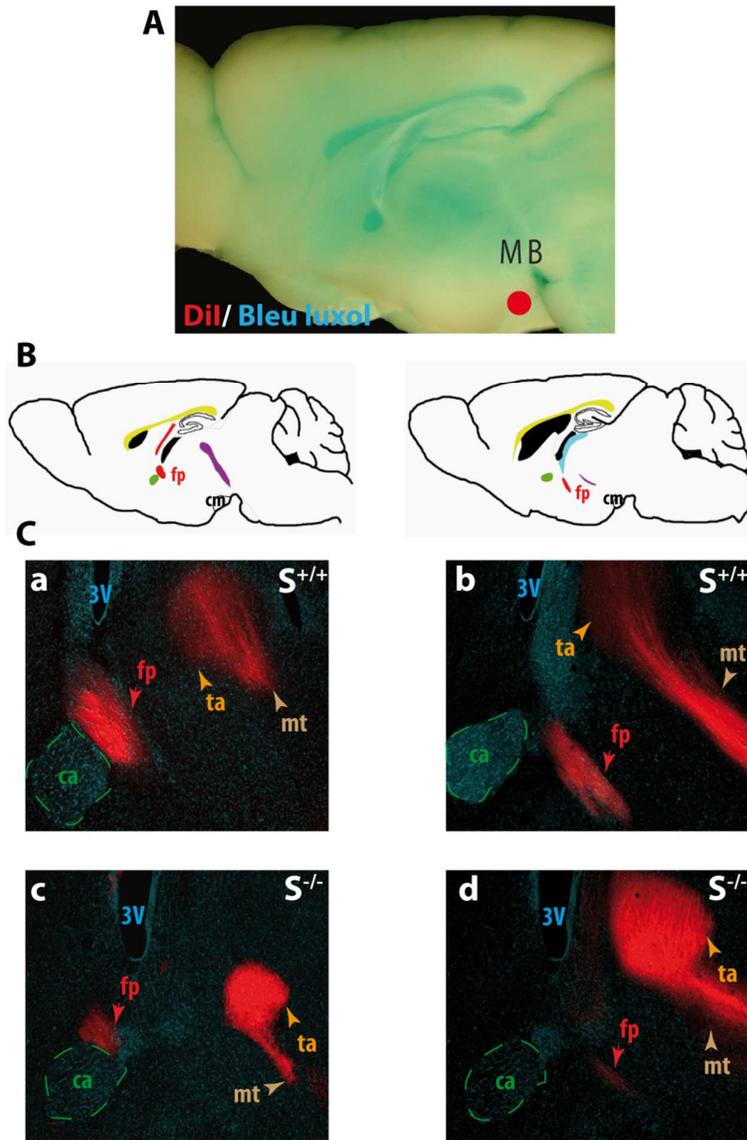


Figure 41 : Analyse de l'intégrité des fibres afférentes du corps mamillaire chez les souris sauvages ($S^{+/+}$) et invalidées ($S^{-/-}$).

A : illustration de l'implantation du cristal de DiI (point rouge) dans le corps mamillaire afin de visualiser ses afférences. **B :** Représentation anatomique schématique des coupes sagittales sélectionnées pour notre étude d'après l'atlas « the Mouse Brain » de G.Paxinos. Le corps calleux est représenté en jaune, la commissure antérieure (*ca*) en vert, le fornix post-commissural (*fp*) en rouge et le corps mamillaire (*cm*) en noir. Les carrés noirs indiquent la position des champs photographiques équivalents aux coupes sagittales des souris $S^{+/+}$ (**Ca et Cb**) et $S^{-/-}$ (**Cc et Cd**) utilisées pour l'analyse de la partie post-commissurale du fornix. *Alv* : alvéus. **C :** **a et b :** 12 semaines après implantation du cristal de DiI, visualisation en rouge, du fornix post-commissural (*fp*), du tract mamillo-thalamique (*mt*) et du thalamus antérieur (*ta*), sur coupe sagittale de cerveau de souris $S^{+/+}$. **c et d :** 12 semaines après implantation du cristal de DiI, visualisation en rouge, de la partie proximale du fornix post-commissural (*fp*), du tract mamillo-thalamique (*mt*) et du thalamus antérieur (*ta*), sur coupe sagittale de cerveau de souris $S^{-/-}$. **a-d :** Les coupes sont contre colorées au Hoechst.

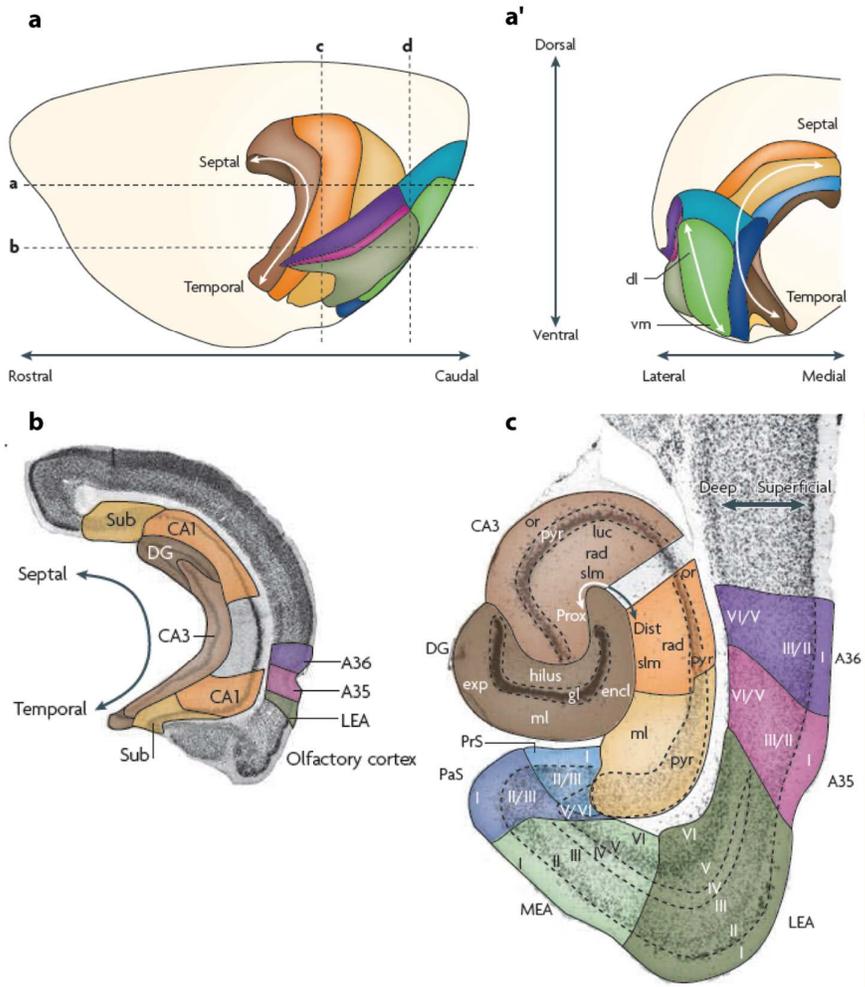


Figure 42 : Représentation de la formation hippocampale et des régions parahippocampales du cerveau de rat (van Strien et al., 2009).

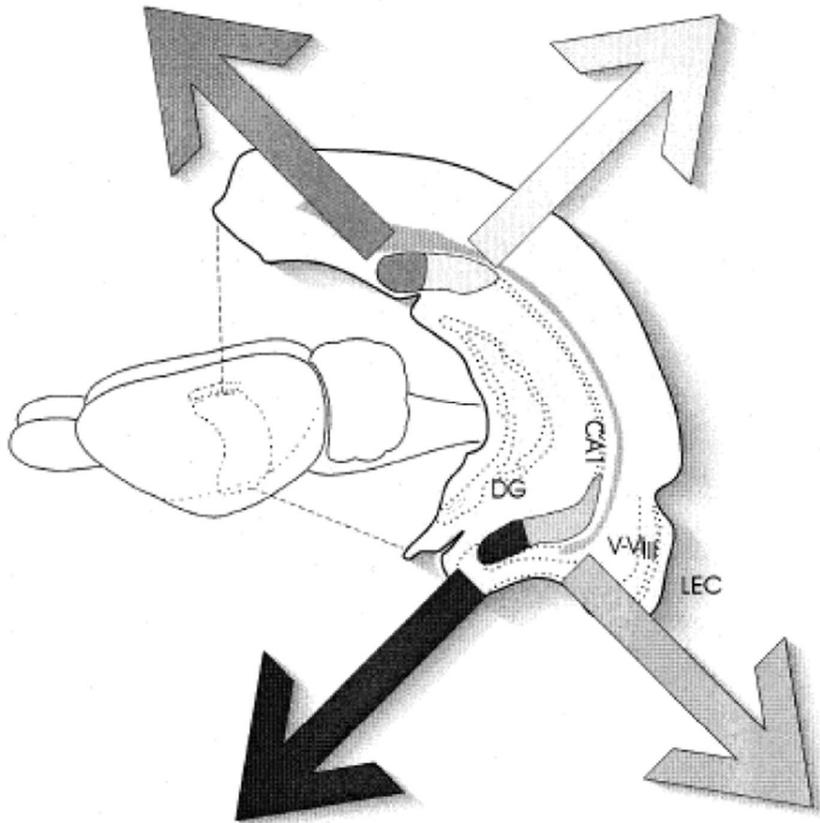
a et **a'**: vue latérale gauche (**a**) et droite (**a'**) de la formation hippocampale (gyrus denté, DG, en marron foncé ; CA3 en marron clair ; la CA1 en orange et le subiculum en jaune) et des régions parahippocampales (cortex perirhinal, rose et violet, cortex postrhinal, POR, bleu turquoise, cortex entorhinal latéral, LEA, vert foncé ; cortex entorhinal médian, MEA, vert clair ; presubiculum, PrS, en bleu ; parasubiculum, PaS, bleu foncé) selon les 3 axes de localisation : rostro-caudal (antéro-postérieur), dorso-ventral (du plus superficiel au plus profond) et septo-temporal (début de l'hippocampe dorsal à la fin de l'hippocampe ventral). **b** : représentation de la formation hippocampale et des régions parahippocampales sur une coupe coronale de cerveau. **c** : représentation horizontale de l'organisation de la formation hippocampale avec les régions parahippocampales. *dist* : distal, *dl* : partie dorsolatérale du cortex entorhinal, *encl* : couche profonde du gyrus denté, *exp* : couche exposée du gyrus denté, *gl* : couche granulaire, *luc* : stratum lucidum, *ml* : couche moléculaire ou stratum oriens, *prox* : proximal, *pyr* : couche de cellules pyramidales, *rad* : stratum radiatum, *slm* : stratum lacunosum-moléculaire, *vm* : partie ventromédiale du cortex entorhinal.

Dorsal-distal subiculum

- medial mammillary nucléus

Dorsal-proximal subiculum

- nucleus accumbens
- lateral septum
- medial mammillary nucleus



Ventral-distal subiculum

- ventromedial hypothalamic nucleus
- medial mammillary nucleus

Ventral-proximal subiculum

- nucleus accumbens
- lateral septum
- ventromedial hypothalamic nucleus
- medial mammillary nucleus

Figure 43 : schéma représentatif des différentes projections des 4 régions du subiculum.

Les quatre sous-régions sont le subiculum dorsal-distal, dorsal-proximal, ventro-distal, ventro-proximal. Les tableaux représentent les différentes régions connectées aux sous-régions du subiculum. *DG* : gyrus denté, *LEC* : cortex entorhinal latéral, *V-VI* : couches profondes du cortex, *III* : couches superficielles du cortex, *CM* : caudomédian, *CL* : caudolatéral, *RL* : rostrolatéral, *RM* : rostromédian, *L* : latéral (d'après Naber et al).

projette sur les corps mamillaires via le fornix. Par ailleurs, nous disposons d'un repère anatomique très précis correspondant à la fusion du subiculum avec le cortex rétrosplénial.

Sur des coupes coronales dont nous avons mis en évidence les neurones (par immunohistochimie dirigée contre la protéine NeuN), il est possible de distinguer les

neurones du subiculum à la fois chez les souris $S^{+/+}$, $S^{+/-}$ et $S^{-/-}$ (figures 44B, 44C et 44D, le subiculum est entouré d'un trait rouge). De plus, la taille du corps cellulaire des neurones semble aussi équivalente entre les 3 génotypes (figure 44E : $S^{+/+}$: $79,9 \mu\text{m}^2$, $n = 6$, $S^{+/-}$: $86,2 \mu\text{m}^2$, $n = 7$ et $S^{-/-}$: $82,9 \mu\text{m}^2$, $n = 4$, $p > 0,05$) ainsi que la densité neuronale du subiculum (figure 44E : $S^{+/+}$: $5816 \text{ neurones/mm}^2$, $n = 6$, $S^{+/-}$: $5925 \text{ neurones/mm}^2$, $n = 7$, $S^{-/-}$: $5363 \text{ neurones/mm}^2$, $n = 4$, $p > 0,05$). Cependant, la surface du subiculum dorsale est réduite de 26% chez les souris $S^{-/-}$ mais reste équivalente entre les souris $S^{+/-}$ et $S^{+/+}$ (figure 44E : $S^{+/+}$: $0,228 \text{ mm}^2$, $n = 6$, $S^{+/-}$: $0,207 \text{ mm}^2$, $n = 7$, $S^{-/-}$: $0,169 \text{ mm}^2$, $n = 4$, $p < 0,05$). Nous avons donc moins de neurones sur ces plans de coupe coronale, dû à la diminution de la surface du subiculum chez les souris $S^{-/-}$ (figure 44E : $S^{+/+}$: $1301 \text{ neurones/subiculum (n/S)}$, $n = 6$, $S^{+/-}$: 1212 n/S , $n = 7$, $S^{-/-}$: 906 n/S , $n = 4$, $p < 0,01$). Ces résultats suggèrent bien que l'absence de la partie post-commissurale du fornix est associée à une perte neuronale du subiculum dorsal chez les souris $S^{-/-}$. Cependant, seule la mise en place d'une méthode stéréologique d'analyse d'image pour la quantification des neurones du subiculum, plus pertinente, permettra de mettre en évidence une réelle perte neuronale.

Ce phénomène ne peut certainement pas être à l'origine de la disparition totale de la partie post-commissurale du fornix. Les neurones censés projeter sur les corps mamillaires, bien que peut être en nombre réduit, sont toujours présents. Nous aurions dû alors observer leurs fibres axonales arriver sur le corps mamillaire par le traçage du Dil, mais aussi par le lentivirus. Une question fondamentale reste encore non résolue : est ce que le fornix disparaît ou ne se forme pas chez les souris $S^{-/-}$? Il y a-t-il oui ou non, une neurodégénérescence des neurones du subiculum associée à la « dégénérescence » du fornix ?

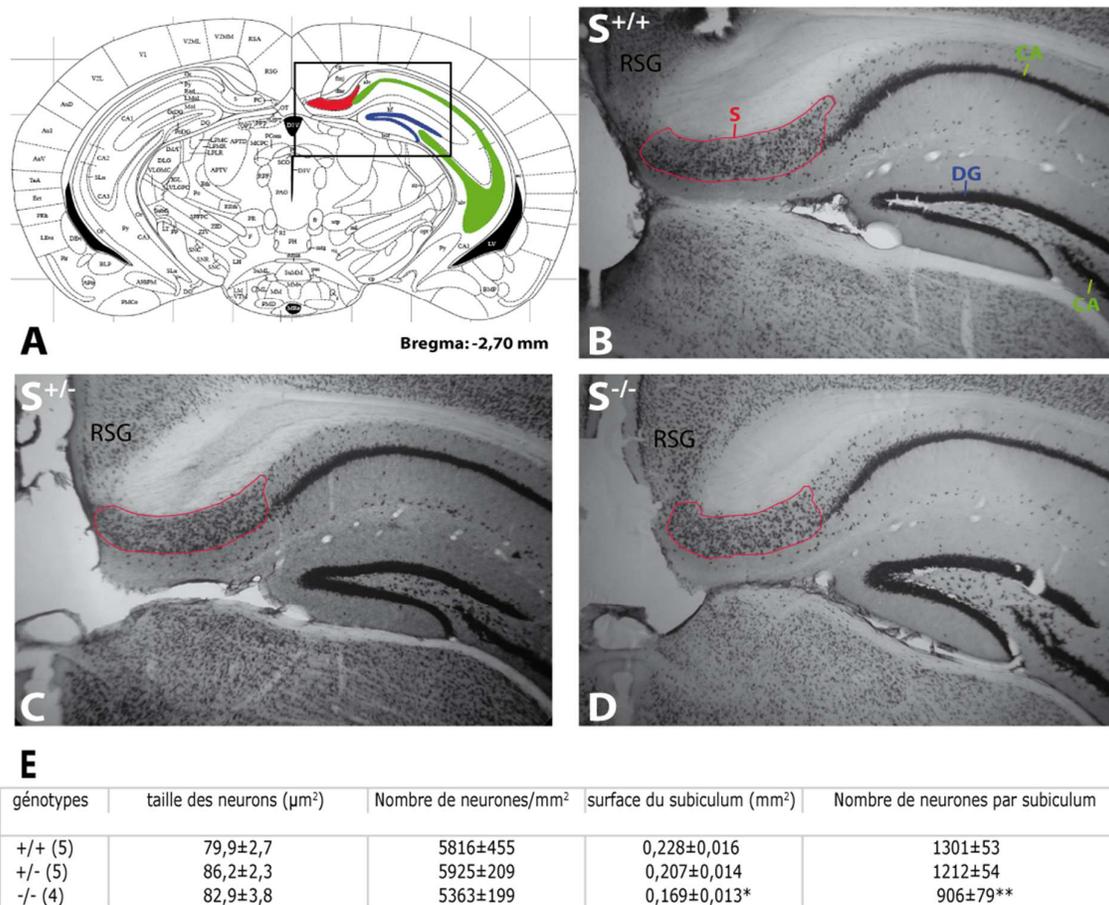


Figure 44 : Différences anatomiques et morphométriques du subiculum dorsal entre souris sauvages ($S^{+/+}$), invalidées ($S^{-/-}$) et hétérozygotes ($S^{+/-}$).

A : Localisation schématique de la position du subiculum (S) sur une coupe coronale de cerveau : le subiculum (en rouge) est accolé du côté médian à la CA1 (en vert) et se situe en dessous du corps calleux. Il fait partie de la formation hippocampale. Le carré noir indique la position des champs photographiques équivalents aux coupes coronales des souris $S^{+/+}$ (**B**), $S^{+/-}$ (**C**) et $S^{-/-}$ (**D**) pour l'analyse de la taille des neurones, du nombre de neurones, de la surface et de la densité neuronale du subiculum dorsal. **B** : Marquage des cellules NeuN (neurones) de la formation hippocampale de cerveau d'animal $S^{+/+}$. Observation au microscope optique x50. DG : gyrus denté, CA : Corne d'Ammon, S : subiculum. La surface du subiculum est entourée par un trait rouge. **C** : Marquage des neurones de la formation hippocampale de cerveau d'animal $S^{+/-}$. Observation au microscope optique x50. La surface du subiculum est entourée par un trait rouge. **D** : Marquage des cellules NeuN de la formation hippocampale de cerveau d'animal $S^{-/-}$. Observation au microscope optique x50. La surface du subiculum est entourée par un trait rouge. **E** : Tableau récapitulatif des moyennes obtenues de la taille des neurones, du nombre de neurones, de la surface et de la densité neuronale du subiculum dorsal de souris $S^{+/+}$, $S^{-/-}$ et $S^{+/-}$. RSG : retrosplenial granular cortex.

4.1.8 Discussion

4.1.8.1 Réduction du volume cérébral de la souris KO STOP et neuropil

Nos résultats montrent clairement une altération majeure du compartiment axonal chez les souris $S^{-/-}$. En effet, afin de mieux comprendre l'origine de la diminution du volume cérébral des souris $S^{-/-}$, nous avons décidé de mesurer, par western blot quantitatif,

plusieurs marqueurs cellulaires. Cette étude globale a permis de montrer que la réduction du volume cérébral n'était pas associée à une perte massive de cellules ou d'une population cellulaire en particulier, mais plutôt à un effondrement du neuropil qui affecterait de façon majeure les axones. Les marqueurs dendritiques que nous avons analysés se réduisent à des marqueurs généraux ou des récepteurs postsynaptiques. Il existe à l'heure actuelle très peu de marqueurs spécifiques de l'architecture des épines dendritiques détectables en western blot. Mais l'étude du compartiment, quoi qu'il arrive demanderait à être approfondie.

Cependant, le fait qu'il n'y ait pas de différence significative dans la quantité de marqueurs ubiquitaires nucléaires n'exclue pas une modification cellulaire locale dans certaines structures du cerveau. En effet, une étude récente a montré que l'épaisseur du cortex des souris $S^{-/-}$ était réduite de 10% (Powell et al., 2007). Par ailleurs, une étude macroscopique menée au laboratoire a montré que la surface des colliculi était plus importante chez les souris $S^{-/-}$. Les colliculi sont des noyaux de la substance grise situés sur la face postérieure du mésencéphale et responsables des réflexes visuels pour les 2 colliculi supérieurs et des réflexes auditifs pour les 2 colliculi inférieurs (communication personnelle, Jacques Brocard). De plus, notre étude préliminaire de la quantification de la population neuronale du subiculum dorsal suggère une réduction du nombre de neurones dans cette région chez les souris $S^{-/-}$. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir à la fois des réductions, mais aussi des augmentations de certaines structures cérébrales chez les souris $S^{-/-}$. L'analyse ne nous permet pas non plus de détecter les éventuels problèmes fonctionnels comme le transport et la distribution sub-cellulaire de certains marqueurs. Par exemple, le transporteur de la sérotonine SERT a été quantifié et l'analyse par western blot ne montre aucune différence significative entre les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ alors que notre laboratoire a permis de montrer une déficience importante des projections axonales sérotoninergiques SERT positives chez les souris $S^{-/-}$ (Vincent Fournet et al, en préparation). La perte de SERT dans les projections axonales est en fait compensée par son accumulation cytoplasmique, ce qui pourrait expliquer en partie, que sa quantité globale dans le cerveau n'est pas modifiée.

Nous avons aussi montré que la plupart des marqueurs myéliniques s'effondraient en western blot. La gaine de myéline, en général, pourrait être moins épaisse, ou bien cela pourrait être la conséquence directe de la diminution du compartiment axonal. Nous avons vu par ailleurs que la surface de nombreux tracts étaient réduits, voire absents chez la souris $S^{-/-}$. Mais cela n'enlève pas la possibilité de défauts de myélinisation ou de réduction de l'épaisseur de myéline chez ces souris. Une étude très récente, en microscopie électronique, effectuée dans notre laboratoire vient de démontrer qu'il n'y avait pas de modification de l'épaisseur de la gaine de myéline des axones composant le corps calleux, tract fortement réduit chez les souris $S^{-/-}$ (Isabelle Lebrun, communication personnelle). Il semble aussi que

la population de cellules progénitrices oligodendrocytaires (cellules NG2⁺) soit réduite. Il faudrait, confirmer ce résultat en comptabilisant à l'aide de technique stéréologique, sur plusieurs régions cérébrales, le nombre de ces cellules, au préalable détectées par immunohistochimie.

4.1.8.2 Souris KO STOP et tracts axonaux cérébraux

Les résultats obtenus en western blot nous ont orienté vers l'analyse histologique de faisceaux axonaux du cerveau des souris S^{-/-}. Nous nous sommes restreints à analyser les tracts myélinisés du système limbique, qui est particulièrement affecté chez les schizophrènes, et qui exprime de fortes quantités de protéines STOP. Ainsi nous avons démontré que la partie post-commissurale du fornix, faisceau principalement constitué des efférences de l'hippocampe, n'est pas visible sur les coupes coronales chez les souris S^{-/-}. D'autres faisceaux du système limbique comme le corps calleux et le faisceau mamillo-thalamique sont également altérés chez ces souris. Cependant la diminution de la surface des faisceaux ne semble pas être une généralité car la commissure antérieure n'est pas affectée. Par ailleurs, l'altération des faisceaux de fibres n'est pas spécifique au système limbique car le faisceau rétroflexe est également réduit chez les souris S^{-/-}. Le faisceau rétroflexe est une efférence de l'habenula. Il semble par ailleurs que l'habenula soit impliquée dans la manifestation de certains symptômes appartenant à la schizophrénie (Couegnas et al., 2007).

Notre observation majeure montre que la partie post-commissurale du fornix n'est pas visible par une coloration luxol sur les coupes coronales des souris S^{-/-}. Des immunofluorescences confirment que l'absence du fornix, lors des colorations au luxol n'est pas uniquement un problème de myélinisation puisque les marqueurs axonaux tels que les neurofilaments sont aussi absents (Caroline Maucler, communication personnelle). L'analyse de l'intégrité du fornix par un traçage lipidique (Dil) confirme aussi l'absence de la partie post-commissurale du fornix. Ces études révèlent la disparition assez brutale du fornix dans sa partie post-commissurale proximale chez les souris S^{-/-}. Cette zone du fornix correspond à un « rond point » pour les efférences subiculaires. En effet, c'est à ce niveau que les axones bifurquent soit dans la partie antérieure de l'hypothalamus, soit dans le noyau thalamique antérieur ou continuent directement vers les corps mamillaires. L'infection lentivirale de GFP nous a permis de mieux caractériser cette zone de rupture et de montrer la dispersion des axones subiculaires à ce niveau. Cette technique d'infection lentivirale nous a permis aussi de révéler d'autres défauts de ce tract. En effet, hormis le fait que les axones semblent se défasciculer et se perdre, ils arborent aussi un aspect granuleux et s'avèrent désorganisés au sein même du tract. Notre étude montre en général que de nombreux tracts axonaux sont

affectés chez la souris $S^{-/-}$. Ces résultats corrèlent très bien avec les troubles de connectivité et de perte de substance blanche observés chez les patients schizophrènes (introduction, paragraphe 2.1.3). En effet, le corps calleux et le cingulum sont deux tracts souvent mentionnés et altérés chez les patients schizophrènes. Par ailleurs, le fornix lui, fait l'objet d'intense recherches en schizophrénie puisque son analyse en imagerie DTI montre non seulement une réduction de son volume, mais aussi un défaut de son intégrité (Kubicki et al., 2005b; Kubicki et al., 2005a; Kuroki et al., 2006; Nestor et al., 2007; Takei et al., 2008; Zhou et al., 2008; Fitzsimmons et al., 2009). La plupart de ces études montrent une parfaite corrélation entre ces défauts du fornix et la perte de mémoire intégrative observée chez ces patients schizophrènes. Nous avons établi une collaboration avec les chercheurs de la plateforme IRM du petit animal, au sein de notre institut, afin de développer les techniques de DTI appliquées à la souris KO STOP. Ce travail nous permettra de savoir si les diminutions des tracts observées sont associées à des modifications de la fraction d'anisotropie, mettant en évidence un défaut de l'intégrité axonale.

Nous avons noté, lors du traçage lentiviral, la présence de varicosités sur les fibres de la partie proximale du fornix post-commissural des souris $S^{-/-}$. Ces varicosités pourraient correspondre soit à des boutons synaptiques, soit à des boursouffures localisées dans les axones en cours de dégénérescence. Or, nous retrouvons, au niveau de la zone de connexion du fornix avec les corps mamillaires, ce même type de varicosité chez les souris $S^{+/+}$, ce qui suggère fortement que ces varicosités correspondraient à des synapses. Afin de connaître la nature exacte de ces varicosités, nous pouvons envisager de combiner le traçage lentiviral-GFP du fornix avec de la microscopie électronique. Nous pourrions alors localiser la GFP par immunohistochimie et analyser l'ultrastructure axonale du fornix post-commissural et étudier ainsi, la nature de varicosités des souris $S^{-/-}$.

L'infection lentivirale nous a permis aussi de mettre en évidence que quelques axones semblent connecter les corps mamillaires chez les souris $S^{-/-}$. Ces résultats ont été confirmés par l'implantation de Dil au niveau des corps mamillaires. Il serait intéressant, par des stimulations isolées du subiculum, de savoir si ces axones « résiduels » sont capables d'assurer une communication entre les corps mamillaires et le subiculum (réponse du corps mamillaire à la stimulation subiculaire). Il serait aussi pertinent de retracer les axones des neurones projetant sur le corps mamillaire à l'aide de traceurs rétrogrades (Fluorogold ou fast blue) injectés au niveau du corps mamillaire. Ces molécules, fluorescentes, passeraient à travers les synapses et remonteraient ainsi jusqu'au corps cellulaires des projections (Wright et al., 2010). Nous pourrions alors mieux comprendre la topographie des neurones subiculaires projetant sur les corps mamillaires chez les souris $S^{-/-}$. Une étude plus approfondie de la structure et la densité neuronale du subiculum, par des techniques

stéréologiques de comptage cellulaire, nous permettra de mieux nous rendre compte de l'intégrité du subiculum dorsal chez les souris $S^{-/-}$.

4.1.8.3 Fornix et dégénérescence axonale

Deux « écoles » de recherche s'opposent quand à l'origine de la mise en place de la schizophrénie : l'école de la dégénérescence des connectivités cérébrales à l'adolescence et l'école de l'hypothèse neurodéveloppementale. L'école de la neurodégénérescence parle en faveur d'une dégénérescence neuronale durant l'adolescence médiée par des défauts majeurs de plasticité synaptique et de mise en place de connections neuronales. Il se pourrait donc que la partie post-commissurale du fornix ait dégénéré chez les souris $S^{-/-}$. Sachant que nous avons effectué notre étude sur des animaux adultes, il serait donc judicieux d'analyser l'intégrité du fornix à des âges périnataux et embryonnaires et de suivre le développement des neurones du subiculum dorsal afin de voir si la partie post-commissurale du fornix se développe ou non. La résection chirurgicale de la partie post-commissurale du fornix chez le rat fut autrefois un modèle utilisé pour l'étude de la dégénérescence axonale. Il a été montré, par ailleurs, que la greffe de cellules de Schwann, les cellules myélinisantes du système nerveux périphérique, permettait la repousse des fibres du fornix et une remyélinisation du tract après connexion avec le corps mamillaire (Stichel et al., 1996). Nous pourrions alors greffer des cellules de Schwann au niveau de la partie proximale du fornix post-commissural chez les souris $S^{-/-}$ et analyser le devenir des fibres fornicales face à ce stimulus.

4.1.8.4 Croissance axonale et protéines STOP

Nous pensons que les phénotypes axonaux (disparition du fornix, diminutions de la surface de tracts et chute des marqueurs axonaux) que nous avons observés chez la souris $S^{-/-}$ seraient la conséquence directe d'une déficience de maturation neuronale médiée par l'absence des protéines STOP dans ces cellules ou dans les cellules sécrétant les molécules régulatrices du processus de maturation (facteurs chimioattractifs, molécule de guidance axonale, pruning et fasciculation axonale). Nous voudrions comprendre pourquoi les neurones du subiculum, en absence des protéines STOP, sont incapables de projeter leur axone sur les corps mamillaires. Récemment, il a été montré que la formation de la partie post-commissurale du fornix était retardée et altérée chez les souris invalidées pour le gène de la sémaphorine 3^E, appelée aussi collapsine (Chauvet et al., 2007). Les effets de la sémaphorine sur la guidance et la croissance axonale dépendent de l'expression intrinsèque de ses récepteurs : plexine D1 et Neuropiline D1. Par ailleurs, nos études de protéomique en spectroscopie de masse montrent que la protéine STOP interagit avec plusieurs protéines

de la famille CRMP (Collapsin Response Mediator Protein). L'une des plus étudiées, CRMP2, participe à la cascade de signalisation induite par la sémaphorine 3^A. Tous ces éléments suggèrent fortement que la protéine STOP participe à la voie de signalisation Semaphorine/CRMP et régule ainsi la guidance et la croissance axonale des neurones du subiculum. Nous allons donc dans un premier temps analyser la croissance *in vitro* des neurones du subiculum de souris S^{-/-}. Nous pourrons alors déterminer si la protéine STOP a un effet direct ou indirect sur la croissance axonale des neurones. Dans un deuxième temps nous essaierons de voir si les neurones du subiculum en culture de souris S^{+/+} et S^{-/-} répondent de façon identique à la stimulation de la sémaphorine. Nous pourrons alors approfondir le rôle des protéines STOP dans le processus de maturation neuronale.

4.2 Deuxième partie : Etude de la neurogenèse adulte chez la souris KO STOP

Les résultats de la première partie nous ont permis de montrer clairement que le cerveau des souris $S^{-/-}$ souffrait d'un déficit axonal majeur et d'une diminution significative de la plupart des faisceaux axonaux du système limbique. Par ailleurs, notre laboratoire a montré une altération du réseau sérotoninergique chez les souris $S^{-/-}$ (Vincent Fournet, communication personnelle) (voir annexe 2). Le nombre de projections sérotoninergiques visualisées par le transporteur de la sérotonine SERT chute de façon spectaculaire dans plusieurs zones du cerveau, dont l'hippocampe et la zone sous ventriculaire (ZSV). Dans ce contexte, nous avons voulu savoir si la neurogenèse adulte pouvait être altérée dans les souris $S^{-/-}$. En effet, la neurogenèse hippocampale adulte est déficiente aussi bien chez les malades dépressifs que schizophrènes. Les antidépresseurs de la famille des inhibiteurs de recaptage de la sérotonine stimulent fortement la neurogenèse adulte hippocampale. De plus, le processus de neurogenèse adulte est directement régulé par l'activité synaptique des neurones environnants et semble aussi jouer un rôle dans les processus d'apprentissage et de mémorisation hippocampal-dépendant, eux aussi altérés dans la schizophrénie (Reif et al., 2006) et chez la souris $S^{-/-}$ (Vincent Fournet, communication personnelle). Nous avons alors analysé les différentes étapes du processus et ce, dans les deux zones du cerveau créant de nouveaux neurones à l'âge adulte : la zone sous ventriculaire/bulbe olfactif ainsi que l'hippocampe. Les travaux d'analyse de la cytogénèse et la neurogenèse long terme du BO et du GD, ainsi que l'analyse du système sérotoninergique chez les souris $S^{-/-}$ ont été soumis à publication dans la revue scientifique *Journal of Neurochemistry* : « **The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network V Fournet*, M Jany*, V Fabre, F Chali, D Orsal, A Schweitzer, A Andrieux, F Messanvi, B Giros, M Hamon, L Lanfumey, JC Deloulme and MP Martres.* Equal contribution** (voir annexe 2).

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, la neurogenèse adulte est la continuité des processus de la neurogenèse neurodéveloppementale. Par conséquent, les étapes cellulaires aboutissant à la naissance de neurones chez l'adulte semblent équivalentes à celles durant la neurogenèse neurodéveloppementale (Alvarez-Buylla et al., 2001). Ce processus chez l'adulte peut être aussi un outil permettant d'analyser les processus de différenciation et de maturation neuronale *in vivo*. La souris $S^{-/-}$ souffrant d'anomalies de la connectivité neuronale et plus particulièrement présentant un déficit axonal, nous avons décidé d'analyser les différentes étapes de la maturation neuronale à

travers le processus de neurogenèse adulte, ce qui représente alors une alternative préliminaire moins lourde à l'utilisation d'embryons de souris.

Un bref rappel de l'introduction concernant les différentes étapes de la neurogenèse adulte : Dans la SVZ et la ZSG, la génération de neurones se déroule en plusieurs étapes cellulaires, séquentielles et similaires (figure 45).

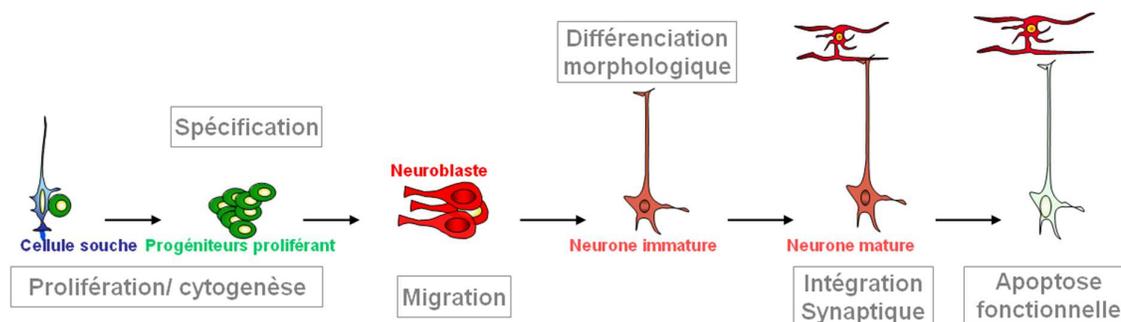


Figure 45 : Représentation des différentes étapes et des types cellulaires impliqués dans le processus de la neurogenèse adulte.

Les étapes sont similaires dans le gyrus denté de l'hippocampe et le système ZSV/BO. Cependant, les neurones nouvellement générés sont différents et spécifiques pour chaque zone.

Les astrocytes germinatifs vont se diviser asymétriquement afin de donner un progéniteur neural à pouvoir prolifératif élevé (cytogénèse). Ce progéniteur proliférant, au fur et à mesure de ses divisions et au contact de facteurs morphogéniques de spécification neuronale, va donner naissance à des neuroblastes. Ceux-ci, tout en migrant, vont se différencier en neurones immatures. Une fois arrivés à destination, ils subissent des maturations morphologiques (pousse neuritique, guidage du cône de croissance axonal par des facteurs chimiotropes et des molécules d'adhérence) et fonctionnelles (expression des récepteurs spécifiques aux neurotransmetteurs et réactivité chimique) devenant ainsi des neurones matures qui pourront s'intégrer dans les réseaux synaptiques existants (BO et hippocampe) (Abrous et al., 2005). Une dernière étape déterminante permettra d'éliminer, par apoptose fonctionnelle, les neurones matures incapables de s'intégrer aux réseaux neuronaux.

4.2.1 La souris KO STOP, un outil pour étudier l'expression de STOP dans les zones de neurogenèse adulte

Afin de savoir si l'absence de la protéine STOP pourrait avoir un impact sur la neurogenèse adulte, nous avons pensé à analyser les différentes étapes de la neurogenèse adulte des deux régions du cerveau ainsi que l'expression de la protéine STOP au cours de

ce processus. Au sein de notre laboratoire, différents anticorps spécifiques de la protéine STOP ont été générés. La révélation immunohistochimique de STOP (en rouge, figures 46A et 46B) ne nous permet pas de marquer les corps cellulaires des neurones granulaires du gyrus denté ni des zones CA1, CA2 et CA3. En effet, la protéine STOP est essentiellement retrouvée au niveau des neurites, notamment dans les axones des neurones granulaires du gyrus denté appelés aussi fibres moussues (figures 46A et 46B). Il est donc impossible, par cette technique, d'apparenter un prolongement neuronal à son corps cellulaire et ainsi savoir quelles cellules expriment la STOP (figures 46A et 46B).

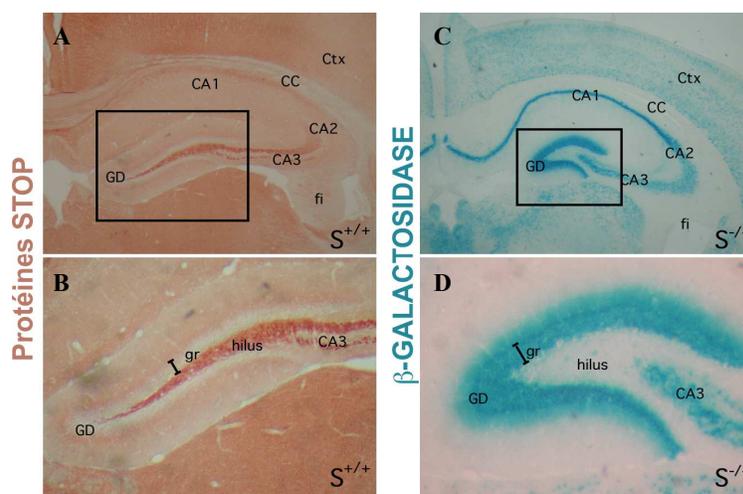


Figure 46 : Etude de l'expression de STOP dans l'hippocampe par immunohistochimie dans la souris $S^{+/+}$ et par test enzymatique de la β -galactosidase, gène rapporteur sous le promoteur de la STOP, dans la souris $S^{-/-}$.

A : Marquage de la protéine STOP par immunohistochimie, dans une souris $S^{+/+}$, à l'aide de l'anticorps 23N (coloration rouge). Observation au microscope optique, grossissement x12. *GD* : gyrus denté, *CA* : corne d'Ammon, *CC* : corps calleux, *Ctx* : cortex, *fi* : fimbria. **B :** Grossissement x3 du gyrus denté à partir de l'image A. *gr* : couche granulaire. **C :** Détection de l'activité β -galactosidase dans l'hippocampe d'une souris $S^{-/-}$ par réaction enzymatique au X-gal (coloration bleue). Observation au microscope optique grossissement x16. **D :** Grossissement x4 du gyrus denté à partir de l'image C.

Les souris $S^{+/-}$ et $S^{-/-}$ ont été génétiquement modifiées en remplaçant la séquence du gène *stop* par la séquence du gène de la β -galactosidase. L'expression de la β -galactosidase chez ces souris est donc sous le contrôle du promoteur de la N- et E-STOP. Une cellule capable d'exprimer les protéines N- et E-STOP exprimera la β -galactosidase chez les souris $S^{-/-}$ et $S^{+/-}$. Dans les neurones $S^{+/-}$ et $S^{-/-}$, la β -galactosidase reste essentiellement cytoplasmique et localisée au niveau du corps cellulaire (très peu de diffusion dans les neurites). Grâce à cet outil, nous pouvons visualiser les corps cellulaires des cellules capables d'exprimer la protéine STOP. Les figures 46C et 46D montrent que la coloration X-gal, révélant la présence de la β -galactosidase, est largement présente dans l'hippocampe. Les neurones pyramidaux de la corne d'Ammon ainsi que les neurones granulaires du gyrus denté sont intensément bleus, montrant que la protéine STOP est

largement exprimée dans ces populations neuronales. Par contre, cette technique ne nous permet pas d'analyser quels types cellulaires expriment la STOP car elle n'est pas adaptée à la réalisation de doubles marquages. Il faut donc pour cela utiliser l'immunofluorescence, technique qui permettra de révéler de façon plus fine et précise la β -galactosidase et les marqueurs spécifiques de chaque type cellulaire, à l'aide de double et triple marquages.

4.2.1.1 Analyse de l'expression de la β galactosidase dans la zone sous granulaire et la couche granulaire du gyrus denté

Dans le gyrus denté de l'hippocampe, les cellules souches et les progéniteurs se situent au niveau d'une couche nommée ZSG qui est localisée entre la couche granulaire (caractérisant les neurones « en grain ») et l'hilus du gyrus denté (où se concentrent des cellules gliales et moussues). Cette ZSG peut être facilement différenciable de la zone granulaire puisque les cellules se trouvant dans la ZSG présentent un noyau marqué intensément par l'Hoechst, plus compact et plus petit que les neurones de la couche granulaire (figure 47a). Ces cellules correspondent aux astrocytes germinatifs, progéniteurs en cours de prolifération et aux neuroblastes.

Dans le gyrus denté, la β -gal est essentiellement présente dans les corps cellulaires des cellules en grain de la couche granulaire mais absente de l'hilus et la ZSG (figure 47b). Nous pouvons remarquer deux types d'expression bien distincts de la β -galactosidase. D'une part, dans la zone supérieure adjacente à la ZSG, le marquage de la β -galactosidase très intense est réparti de façon homogène dans les corps cellulaires. D'autre part, dans les couches supérieures de la zone granulaire, le marquage plus faible est principalement ponctiforme (figure 47b). Cette répartition marque un gradient d'expression de la β -galactosidase dans le gyrus denté.

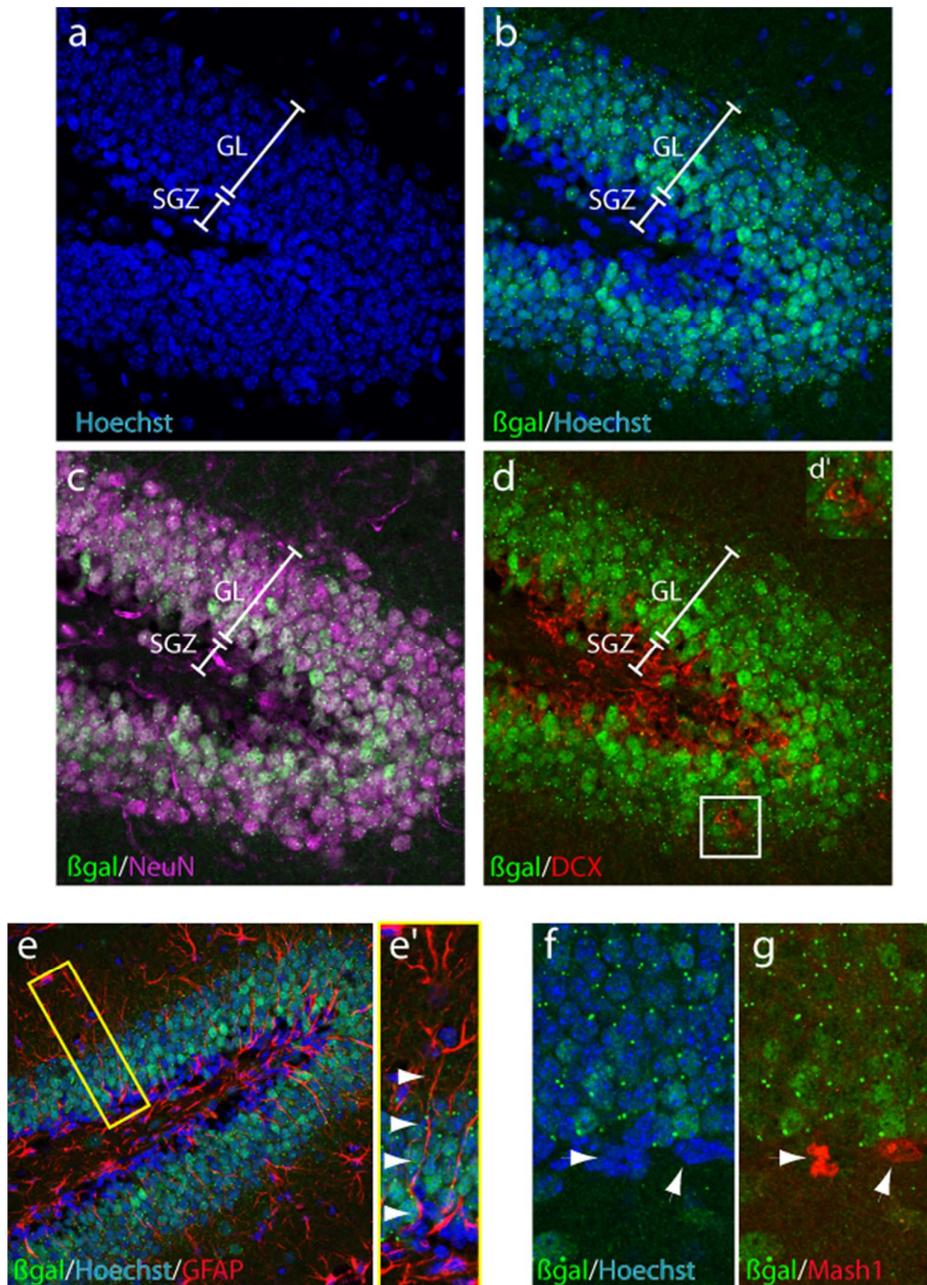


Figure 47 : Analyse du patron d'expression de la β -galactosidase dans la zone germinative du gyrus denté de l'hippocampe, chez la souris $S^{+/-}$.

SGZ : zone sous granulaire, *GL* : zone granulaire, *β -gal* : β -galactosidase. **a** : marquage des noyaux des cellules du gyrus denté par Hoechst. **b** : répartition de la β -galactosidase dans le gyrus denté de l'hippocampe. **c** : Analyse de l'expression de la β -galactosidase dans les neurones matures et immatures (cellules $NeuN^+$). **d** : Analyse de l'expression de la β -galactosidase dans les neuroblastes (cellules DCX^+). **e** : Analyse de l'expression de la β -galactosidase dans les cellules $GFAP^+$: cellules souches neurales de la ZSG (►). **e'** : encart de e sur une cellule souche neurale et mise en évidence de son prolongement spécifique $GFAP^+$ (►). **f** et **g** : Analyse de l'expression de la β -galactosidase dans les progéniteurs proliférant de la zone sous granulaire du gyrus denté (cellules $Mash1^+$).

Les cellules β -gal⁺ se trouvant dans la zone granulaire sont toutes des cellules NeuN⁺ (figure 47c). NeuN est une protéine nucléaire qui est spécifiquement exprimée par les neurones immatures et matures. La protéine cytosquelettique DCX est un marqueur transitoire exprimé principalement par les neuroblastes (progéniteurs neuronaux) mais aussi par les neurones immatures (Walker et al., 1999). La combinaison d'expression de NeuN et DCX caractérise donc les neurones immatures. Nos triples marquages ont clairement démontré que les neurones immatures DCX⁺/NeuN⁺ et matures DCX⁻/NeuN⁺ expriment la β -galactosidase (figures 47c et d). Cependant, les neuroblastes DCX⁺/NeuN⁻ se situant principalement dans la zone sous-granulaire, sont en majorité dépourvus de β -galactosidase (figures 47d et d'). Le patron d'expression de la β -galactosidase corrèle très fortement à celui de NeuN, suggérant que la protéine STOP est exprimée dans les neurones immatures comme matures.

Les astrocytes germinatifs se situent au niveau de la ZSG, ont une morphologie d'astrocytes radiaires et présentent un prolongement GFAP⁺ qui traverse les couches granulaires du gyrus denté. Les figures 47e et 47e' (flèches blanches) nous montrent bien que les corps cellulaires des astrocytes radiaires sont dépourvus de β -galactosidase. Par ailleurs, des cellules exprimant le facteur de transcription Mash1, caractérisant les progéniteurs proliférant, sont eux aussi dépourvus de β -galactosidase (figures 47f et g).

L'analyse du patron d'expression de la STOP dans le gyrus denté de l'hippocampe est récapitulée dans la figure 48. Les astrocytes germinatifs, les progéniteurs proliférant ainsi que les neuroblastes ne semblent pas exprimer de protéine STOP. Cette protéine apparaît assez tardivement dans la neurogenèse adulte hippocampale puisqu'elle est exprimée seulement par les neurones immatures et matures. La protéine STOP semble apparaître au même moment que NeuN, ce qui laisse penser qu'elle pourrait être impliquée dans les processus de maturation neuronale adulte.

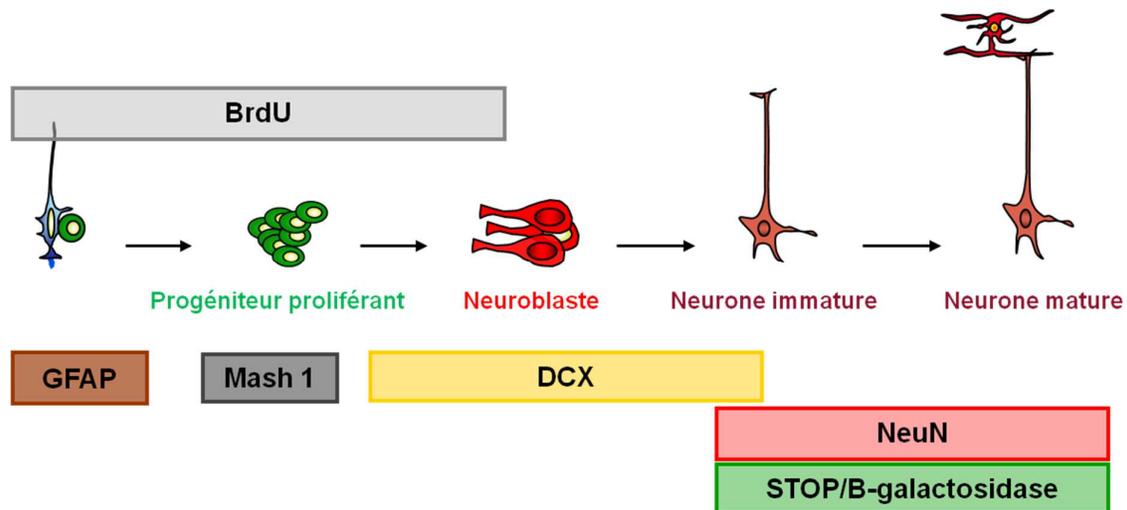


Figure 48 : Représentation schématique du patron d'expression de la protéine STOP dans les différents types cellulaires impliqués dans la neurogenèse adulte du gyrus denté de l'hippocampe.

GFAP : glial fibrillary acidic protéin, *DCX* : double cortine X, *NeuN* : neuron nuclear protéin. *GFAP*, *Mash 1*, *DCX* et *NeuN* sont les marqueurs utilisés pour caractériser les différents types cellulaires représentés.

4.2.1.2 Analyse de l'expression de la β galactosidase dans la zone sous ventriculaire et dans le bulbe olfactif

Dans la ZSV, zone du cerveau qui borde le troisième ventricule, les cellules souches neurales (précurseurs primaires) et les progéniteurs se situent au niveau des couches adjacentes au ventricule bordé par les cellules épendymaires (ayant pour rôle de brasser le liquide céphalo-rachidien) (figures 49a, b et c). Nous avons analysé le patron d'expression de la β galactosidase (β -gal), premièrement dans la zone sous ventriculaire latérale, où se forment les neuroblastes, puis dans le bulbe olfactif où ils finissent leur migration et leur différenciation neuronale. Il n'y a strictement aucune immunoréactivité de la β -galactosidase dans la zone sous ventriculaire : les neuroblastes DCX^+ n'expriment pas la β -galactosidase (figures 49c et e). En revanche, nous pouvons observer que les neurones du striatum, région adjacente à la ZSV, expriment la β galactosidase (figures 49d, e et f). Nous nous sommes

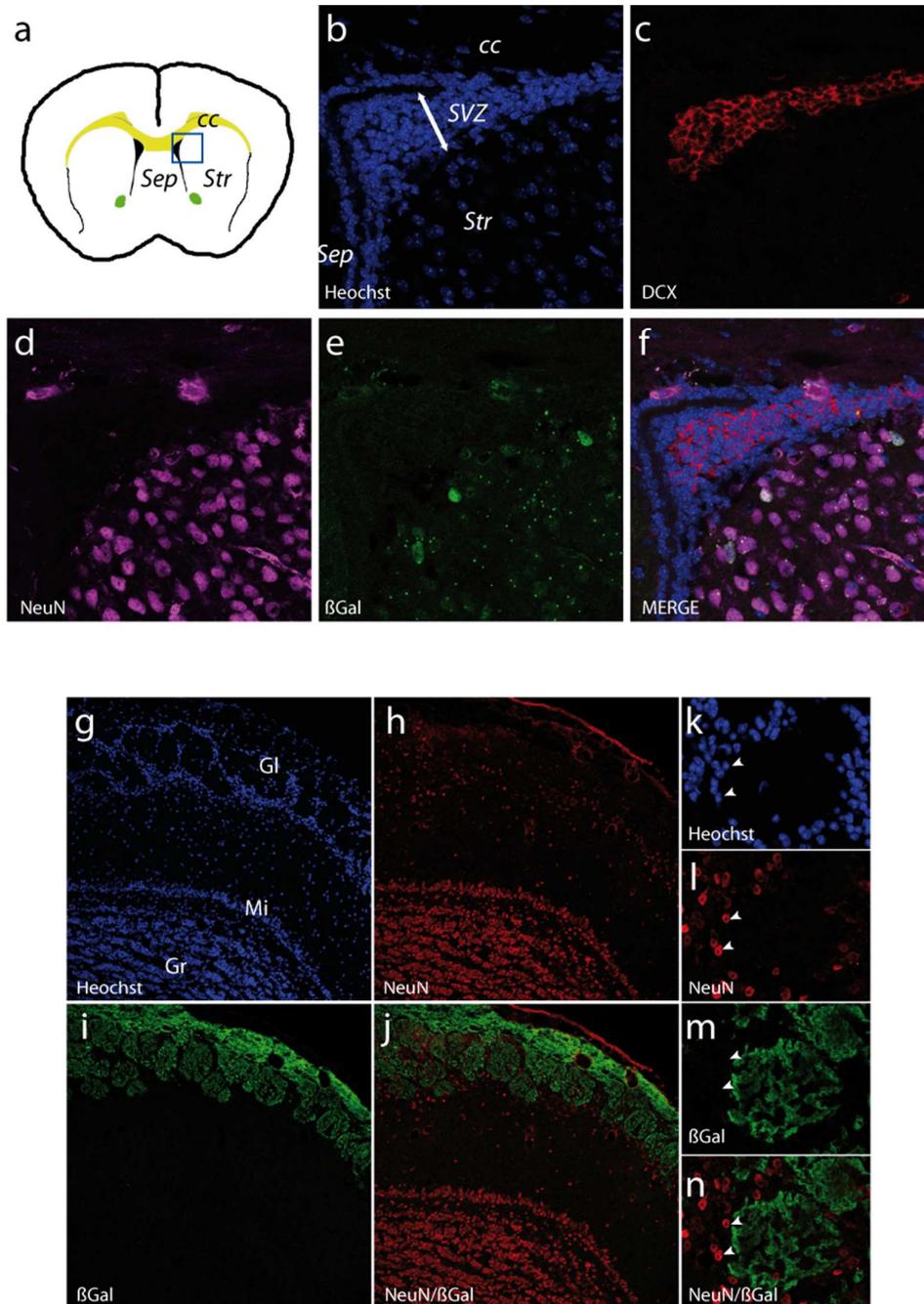


Figure 49 : Analyse du patron d'expression de la β -galactosidase dans la zone sous ventriculaire et le bulbe olfactif chez la souris $S^{+/-}$.

a : Localisation schématique de la ZSV sur coupe coronale de cerveau. **b :** marquage des noyaux des cellules de la ZSV par Hoechst. **c :** localisation des neuroblastes dans la ZSV (cellules DCX^{+}). **d :** localisation des neurones du striatum. **e :** répartition de la β -galactosidase dans la ZSV. **f :** analyse de l'expression de la β -galactosidase dans les neurones du striatum (cellules $NeuN^{+}$) et des neuroblastes de la ZSV (cellules DCX^{+}). **g-n :** images confocales d'immunofluorescence de la β -galactosidase (vert) et des interneurons granulaires et périglomérulaires $NeuN^{+}$ (rouge) de coupes coronales de bulbe olfactif d'animaux $S^{+/-}$. L'expression de la β -galactosidase est restreinte aux tracts axonaux provenant de l'émergence des axones des neurones de l'épithélium olfactif. Un grossissement des glomérules du bulbe olfactif montre l'absence de β -galactosidase au sein des interneurons périglomérulaires (**k-n**, têtes de flèche). *Gl* : glomérule, *Mi* : couche de cellules mitrales, *Gr* : couche granulaire, β -gal : β -galactosidase, *cc* : corps calleux, *str* : striatum, *sep* : septum.

intéressés aux deux populations neuronales produites chez l'adulte dans le bulbe olfactif que sont les neurones granulaires et périglomérulaires. Dans le BO, les corps cellulaires de ces deux types de neurones ne présentent aucune immunoréactivité pour la β galactosidase (figures 49h, i et j). En revanche, nous observons une immunoréactivité pour la β -galactosidase au niveau des glomérules du bulbe olfactif, zone regroupant les faisceaux d'axones des neurones de l'épithélium olfactif qui viennent connecter les neurones périglomérulaires (figures 49j, m et n) (Richard et al., 2009). Contrairement à ce qui est observé dans le gyrus denté, la protéine STOP n'est jamais exprimée par les neurones néoformés du bulbe olfactif adulte.

4.2.2 Analyse de la neurogenèse adulte du bulbe olfactif chez les souris KO STOP

4.2.2.1 Etude de la cytogénèse dans la zone sous ventriculaire

Nous avons mesuré la cytogénèse (prolifération des progéniteurs proliférant) en injectant dans les souris, un marqueur de prolifération, la bromo-déoxy-uridine (*BrdU*) détectable par immunohistochimie. La figure 50Aa montre que la densité de cellules BrdU⁺ (marquage marron) est élevée, nous avons donc délimité un espace identique pour toutes les coupes de cerveau dans lequel les cellules BrdU⁺ ont été comptabilisées. Les cellules BrdU⁺ se concentrent au niveau de la ZSV du mur ventriculaire. Le comptage des cellules BrdU⁺ dans la ZSV, après deux jours d'injection (figure 50Ad), nous indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois groupes d'animaux (souris S^{+/+} : 106 cellules BrdU⁺, n = 5 ; souris S^{+/-} : 98 cellules BrdU⁺, n = 4 ; souris S^{-/-} : 100 cellules BrdU⁺, p > 0.05, n = 4). Ainsi, la cytogénèse de la ZSV n'est pas altérée chez les souris S^{-/-} et S^{+/-}.

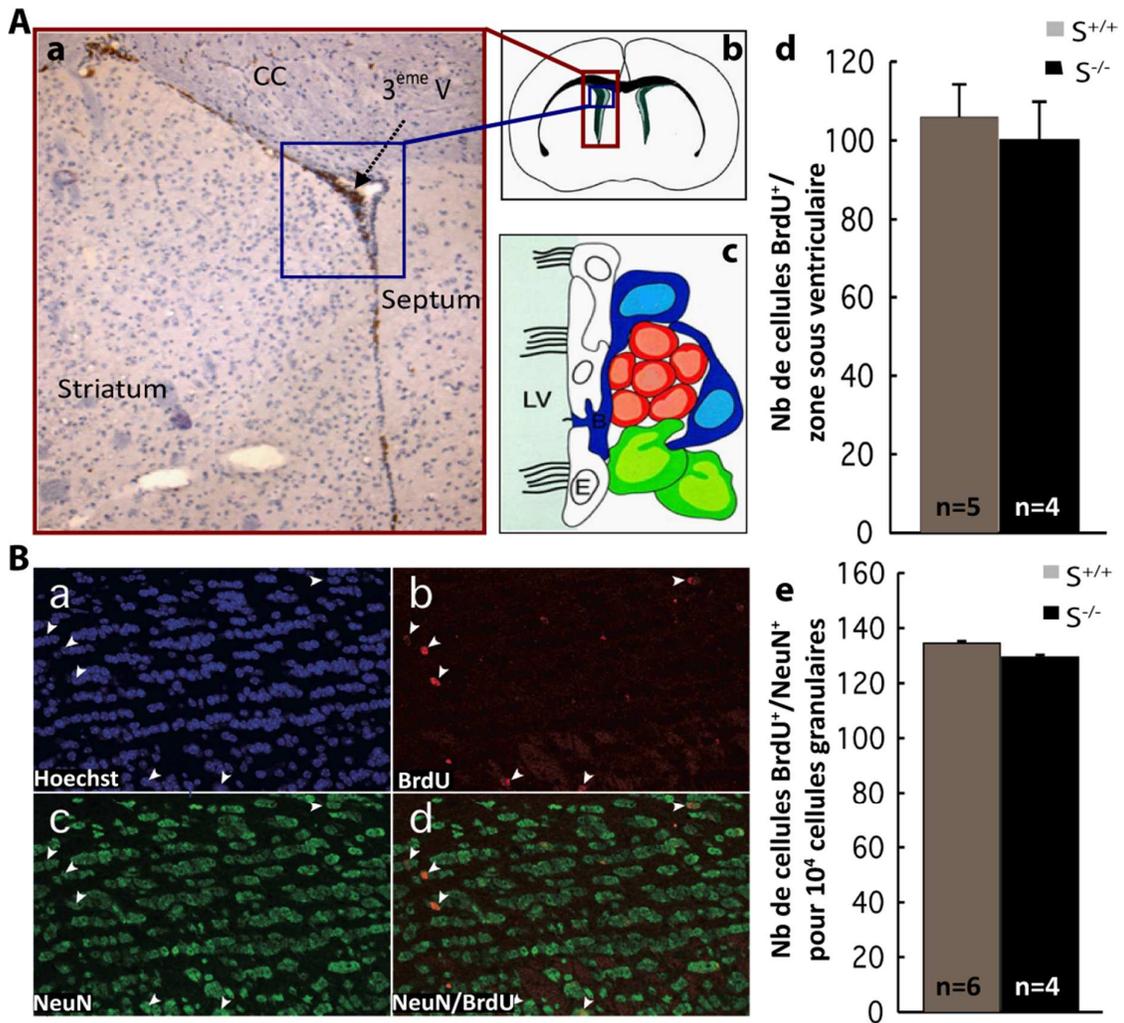


Figure 50 : Analyse de la neurogenèse adulte de la zone sous ventriculaire (ZSV) des souris sauvages (S^{+/+}) et invalidées (S^{-/-}).

A : **a :** Marquage des cellules BrdU⁺ dans la ZSV sur coupe coronale de cerveau d'animal S^{+/+} au bout de deux jours d'injections biquotidiennes de BrdU. Observation au microscope optique X60. CC : corps calleux, 3^{ème} V : 3^{ème} ventricule. **b :** Localisation schématique de la ZSV sur coupe coronale de cerveau. **c :** Schéma représentatif de la localisation des cellules souches neurales (bleu), progéniteurs proliférant (vert) et neuroblastes (rouge) dans la ZSV. LV : ventricule latéral, E : cellules épendymaires. **d :** Histogramme des comptages de cellules BrdU⁺ dans la ZSV d'animaux S^{+/+} et S^{-/-}. **B :** Analyse du nombre de neurones *in fine* nouvellement générés dans le bulbe olfactif. **a :** Marquage au Hoechst des noyaux des cellules de la zone granulaire du bulbe olfactif. **c :** Marquage des neurones de la zone granulaire (vert). **b :** Marquage des cellules BrdU⁺ nouvellement générées (rouge, têtes de flèche blanches) dans la zone granulaire du bulbe olfactif, 6 semaines après injection de la BrdU. **d :** Ces cellules BrdU⁺ se différencient en interneurons matures NeuN⁺ (vert, têtes de flèche blanches). **e :** Histogramme des comptages de cellules BrdU⁺/NeuN⁺ de la zone granulaire du bulbe olfactif d'animaux S^{+/+} et S^{-/-}.

4.2.2.2 Neurogenèse et survie des neurones néoformés de la zone sous ventriculaire

La cytogénèse n'étant pas affectée chez les souris $S^{-/-}$, nous avons analysé le taux de neurones néoformés dans le bulbe olfactif. Les neuroblastes nouvellement générés migrent le long de la RMS et atteignent les bulbes olfactifs où ils vont migrer de façon radiaire dans la zone granulaire (interneurones granulaires) et dans les zones périglomérulaires (interneurones périglomérulaires) (figure 50B). Pour des raisons techniques et statistiques, nous avons comptabilisé les neurones néoformés uniquement dans la zone granulaire. En effet, cette zone est anatomiquement plus facile à identifier que les zones périglomérulaires. Par ailleurs, la proportion de neurones granulaires néoformés est beaucoup plus importante que celle des zones périglomérulaires. Pour cela nous avons utilisé la technique de chasse de BrdU et comptabilisé les neurones granulaires 6 semaines après injection, période nécessaire à l'intégration de neurones néoformés dans le bulbe olfactif (Abrous et al., 2005). Ces neurones nouvellement générés dans la zone granulaire sont facilement détectables grâce à la BrdU et à leur expression de la protéine neuronale NeuN (cellules $BrdU^+/NeuN^+$, figures 50Bb et 50Bd). Les comptages du nombre de neurones $BrdU^+/NeuN^+$ dans la zone granulaire du bulbe olfactif indiquent qu'il n'y a aucune différence significative entre les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ (figure 50Be, souris $S^{+/+}$: 135 cellules $BrdU^+/NeuN^+$ pour 10^4 cellules granulaires, $n = 6$; souris $S^{-/-}$: 130 cellules $BrdU^+/NeuN^+$ pour 10^4 cellules granulaires, $n = 4$, $p > 0,5$). Ces résultats indiquent que les étapes de neurogenèse tardive du bulbe olfactif adulte ne sont pas altérées chez la souris $S^{-/-}$. Par ailleurs, une gliogenèse est associée à la neurogenèse adulte, permettant la création de cellules gliales dans la zone granulaire du BO. Nous avons aussi analysé le taux de cellules gliales ($BrdU^+/S100B^+$) nouvellement générées et il n'y a, là aussi, aucune différence significative (résultats non exposés en figure).

Dans le système ZSV/BO, nous n'observons aucune altération du processus de neurogenèse adulte.

4.2.3 Analyse de la neurogenèse adulte hippocampale chez les souris KO STOP

4.2.3.1 Analyse de la cytogénèse dans la zone sous granulaire du gyrus denté

Nous avons utilisé deux fonds génétiques différents de souris pour cette étude. En effet, l'étude a débuté sur des souris de fond génétique 129/Balbc qui provenaient de la génération F2. Ce fond génétique n'était pas homogène puisque la délétion de la protéine STOP n'était transmise que par la souche 129 (matériel et méthodes, A1). Par ailleurs, les

souris $S^{-/-}$ appartenant à ce fond génétique présentait la plupart du temps une rupture du genou du corps calleux (souvent décrit chez les souris de fond 129), ce qui compliquait considérablement l'analyse histologique de leur cerveau. Le laboratoire a donc décidé de continuer ses études sur un nouveau fond génétique de génération F1, 50% 129 et 50% C57Bl6, ne présentant pas ces anomalies du corps calleux. Nous présenterons donc les résultats pour les deux fonds génétiques.

Le siège de la cytogénèse hippocampale se situe dans la zone sous granulaire du gyrus denté (ZSG). Après deux jours d'injection de BrdU, les cellules BrdU⁺ (flèches vertes, figures 51A et 51B), chez les souris $S^{+/+}$, se retrouvent principalement regroupées sous forme de « cluster », qui caractérise la division clonale des astrocytes germinatifs (voir grossissement d'un « cluster » figure 51A). Quelques cellules demeurent aussi isolées. Pour les souris $S^{-/-}$, en revanche, les « clusters » semblent moins abondants et le nombre de cellules composant le « cluster » plus faible que chez les souris $S^{+/+}$ (figure 51B). Nous retrouvons beaucoup plus de cellules isolées dans le gyrus denté des souris $S^{-/-}$ que dans celui des souris $S^{+/+}$. Le comptage des cellules BrdU⁺ dans le gyrus denté de l'hippocampe des souris $S^{+/+}$, $S^{+/-}$ et $S^{-/-}$ confirme bien cette différence dans les deux fonds génétiques utilisés (figures 51C et 51D). En effet, nous observons une réduction significative de 35% du nombre de cellules BrdU⁺ de l'hippocampe des souris $S^{-/-}$ par rapport aux souris $S^{+/+}$ du fond génétique 129/Balbc (figure 51C : $S^{-/-}$: 647 cellules BrdU⁺ par gyrus denté, $n = 7$; $S^{+/+}$: 998 cellules BrdU⁺, $n = 8$, $p < 0.01$). Les souris $S^{-/-}$ du fond génétique 129/C57Bl6 présentent aussi une diminution significative de 33% du nombre de cellules BrdU⁺ dans l'hippocampe, par rapport aux souris $S^{+/+}$ (figure 51D : $S^{-/-}$: 51 cellules BrdU⁺ par gyrus denté, $n = 6$; $S^{+/+}$: 34 cellules BrdU⁺, $n = 9$, $p < 0.03$). Cette réduction révèle donc une déficience dans le processus de cytogénèse du gyrus denté chez les souris $S^{-/-}$.

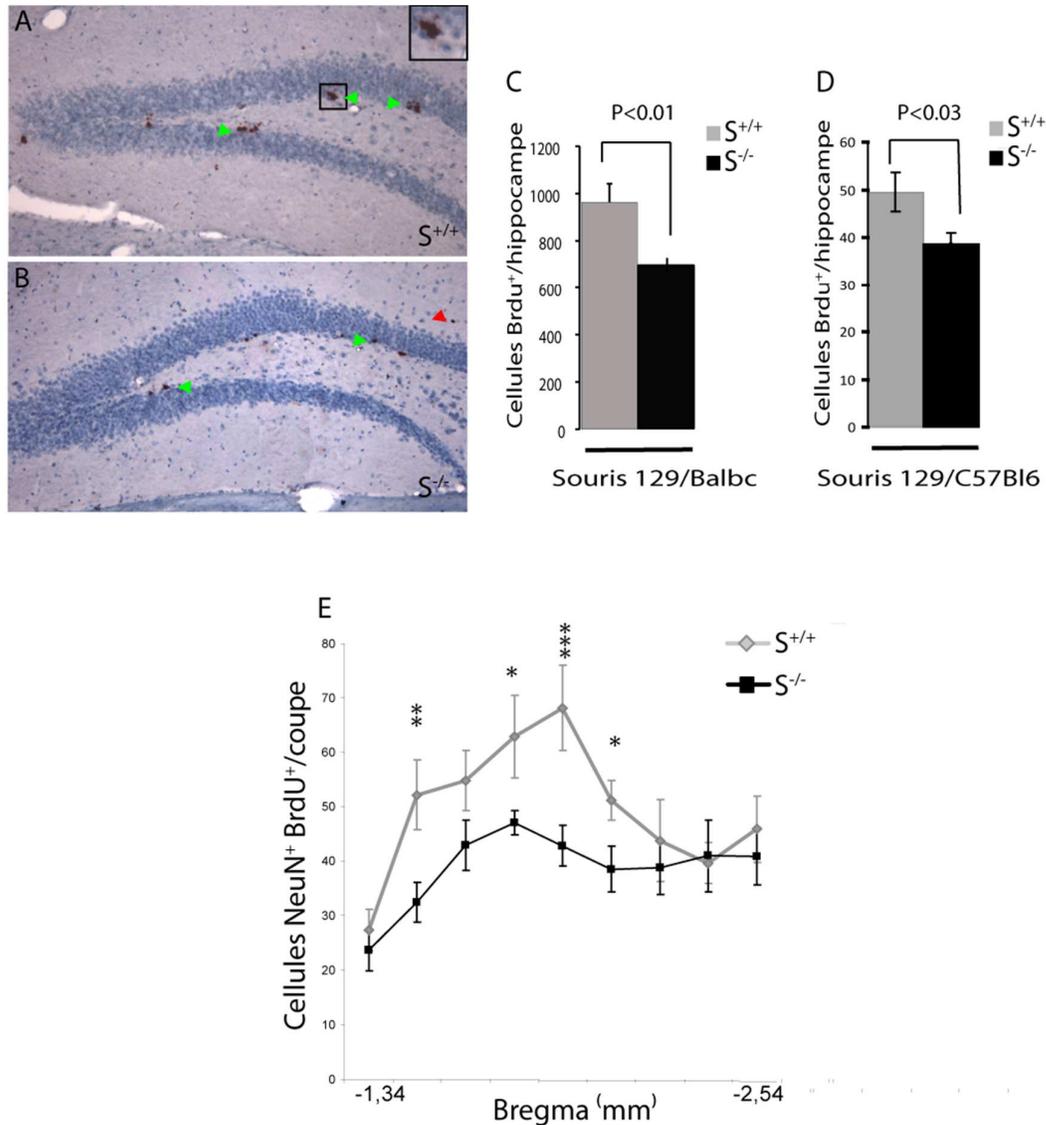


Figure 51 : Analyse de la prolifération des cellules souches et progéniteurs proliférant dans la ZSG du gyrus denté et dans l'hilus de souris sauvages (S^{+/+}) et invalidées (S^{-/-}) par immunohistochimie

A : Marquage des cellules BrdU⁺ dans le gyrus denté de l'hippocampe sur coupe coronale de cerveau d'animal S^{+/+}. Observation au microscope optique X50. GD : gyrus denté, Encart noir : cluster, * : cellules BrdU⁺, ▲ : Cellules souches et progéniteurs proliférant. **B :** Marquage des cellules BrdU⁺ dans le gyrus denté de l'hippocampe sur coupe coronale de cerveau d'animal S^{-/-}. ▲ : Cellules souches et progéniteurs proliférant, ▲ : Astrocytes. **C :** Histogramme des comptages de cellules BrdU⁺ dans la ZSG du gyrus denté d'animaux S^{+/+} et S^{-/-} de fond génétique 129/Balbc. **D :** Histogramme des comptages de cellules BrdU⁺ dans la ZSG du gyrus denté d'animaux S^{+/+} et S^{-/-} de fond génétique 129/C57Bl6. **E :** Représentation rostro-caudale du nombre moyen de cellules BrdU⁺ de la ZSG de chaque coupe utilisée d'hippocampe de souris S^{+/+} et S^{-/-} 129/C57Bl6. * : p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,005.

En revanche, la diminution de 25% du nombre de cellules BrdU⁺ observée chez les souris S^{+/-} n'est pas significative (souris S^{+/-} : 816 cellules BrdU⁺ par gyrus denté, n = 4, p > 0.05, résultats non exposés en figure). La cytogenèse du gyrus denté des souris S^{+/-} est, certes, plus faible que celle des souris S^{+/+} mais cette différence ne nous permet pas de conclure sur la déficience de la cytogenèse chez les souris S^{+/-}. Chez les souris S^{+/+} le profil

de cellules BrdU⁺ en fonction de la coupe coronale d'hippocampe forme un pic avec un maximum sur la coupe correspondant au bregma 1.69 (figure 51E). Chez les souris S^{-/-}, ce pic se trouve fortement affaissé sur toute sa largeur, montrant une réduction globale et non locale du nombre de cellules BrdU⁺.

Après deux jours de traitement à la BrdU, nous avons pu observer que d'autres cellules incorporaient la BrdU dans des zones limitrophes au gyrus denté, notamment dans l'hilus (figure 51B). De nombreuses études ont démontré que ces cellules correspondent à des précurseurs de cellules gliales (Steiner et al, 2004). Nous avons donc décidé d'analyser ce processus afin de voir s'il était modifié chez les souris S^{-/-}. Il semble n'y avoir aucune différence significative dans ce processus entre les souris S^{+/+}, S^{+/-} et S^{-/-} (S^{+/+} : 154 cellules BrdU⁺ par hilus, n = 6 ; S^{+/-} : 164 cellules BrdU⁺, n = 4 et S^{-/-} : 133 cellules BrdU⁺, n = 4, p > 0.05, résultats non exposés en figure). La gliogenèse de l'hilus du gyrus denté n'est donc pas altérée chez les souris S^{-/-}.

Ces résultats indiquent que les souris S^{-/-} ne présentent pas d'altération de la cytogénèse de la ZSV et de la prolifération des cellules gliales de l'hilus. En revanche, la cytogénèse est spécifiquement altérée au niveau du gyrus denté de l'hippocampe des souris S^{-/-}.

4.2.3.2 Dosage du BDNF dans l'hippocampe

Les cellules souches et les progéniteurs proliférant du gyrus denté n'exprimant pas de protéine STOP, nous pensons que l'absence de la protéine STOP au niveau du gyrus denté, entrainerait la mise en place d'un environnement cellulaire des progéniteurs non permissif à leur prolifération. Nous avons vu auparavant que la cytogénèse était finement régulée par une multitude de facteurs extrinsèques, comme l'activité des neurones environnants, les mécanismes de plasticité synaptique, les neurotransmetteurs mais aussi certains facteurs de croissance et de survie comme le BDNF. Le BDNF est un facteur neurotrophique important pour l'hippocampe puisqu'il régule à la fois la prolifération des cellules souches et des progéniteurs et la survie des neurones en cours de maturation via l'expression de son récepteur, trkB. De plus, l'action du BDNF semble étroitement liée à la neurotransmission sérotoninergique (Neckameyer, 2010). Ainsi la sérotonine et le BDNF agissent généralement en synergie et l'altération de l'un entraîne une dysfonction de l'autre (Deltheil et al., 2009). Il semble par ailleurs que la transmission sérotoninergique soit altérée dans le cerveau des souris S^{-/-}, nous pensons alors qu'une déficience de la voie de signalisation BDNF pourrait être à l'origine de la réduction de cytogénèse hippocampale chez la souris S^{-/-}.

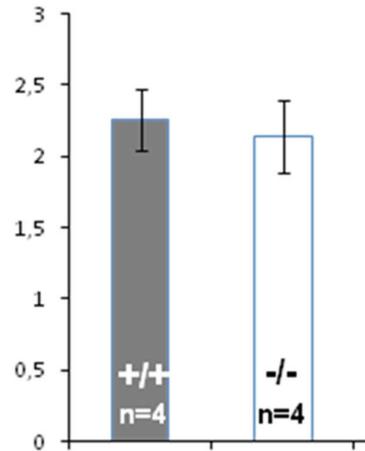


Figure 52 : Dosage du BDNF dans l'hippocampe de souris sauvages ($S^{+/+}$) et invalidées ($S^{-/-}$) par la technique d'ELISA.

Histogramme représentatifs de la moyenne de la quantité de BDNF dans l'hippocampe dorsal et ventral de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$.

Nous avons donc analysé la quantité de BDNF présente dans l'hippocampe de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ par la méthode ELISA. Les résultats préliminaires obtenus indiquent qu'il n'y a aucune différence significative dans la quantité de BDNF entre les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ (figure 52 : $S^{+/+}$: 2,25 pg/mg de protéines, n = 4 ; $S^{-/-}$: 2,13 pg/mg de protéines, n = 4). Bien que ces résultats ne soient que préliminaires, il ne semble pas qu'une diminution des quantités de BDNF soit à l'origine de la réduction de la cytogénèse hippocampale.

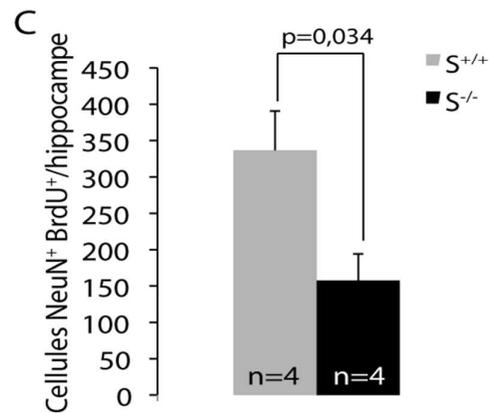
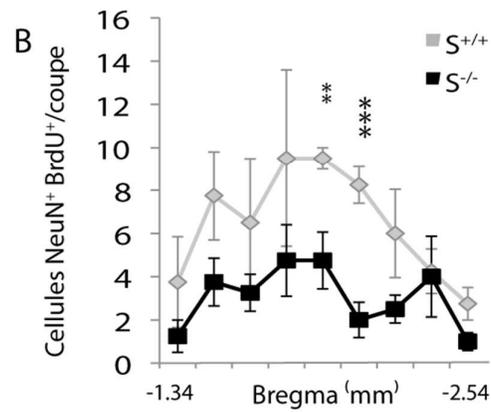
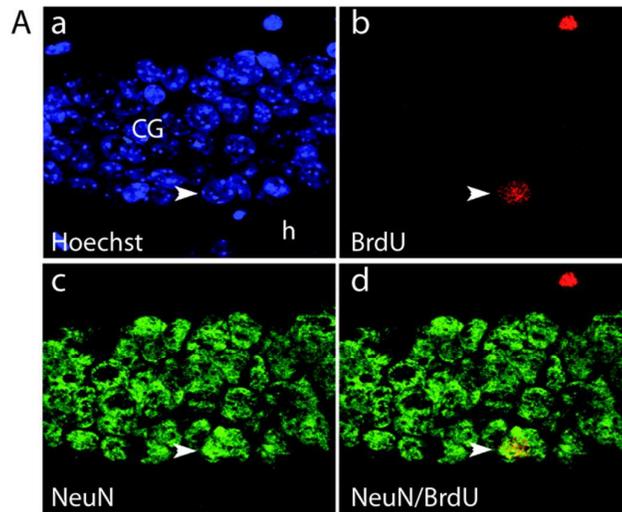


Figure 53 : Analyse du nombre in fine de neurones nouvellement générés dans le gyrus denté de souris sauvages (S^{+/+}) et invalidées (S^{-/-})

A : Image confocale mettant en évidence une cellule nouvellement générée BrdU⁺ (rouge) dans la zone granulaire (b) se différenciant en neurone mature (tête de flèche) et exprimant le marqueur NeuN (vert) (c, d). **B :** Représentation rostro-caudale du nombre moyen de neurones granulaires BrdU⁺/NeuN⁺ de souris S^{+/+} et S^{-/-} nouvellement générés, de chaque coupe d'hippocampe utilisée. * : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,005. **C :** Histogramme des comptages de cellules BrdU⁺/NeuN⁺ dans la zone granulaire du gyrus denté d'hippocampe de souris S^{+/+} et S^{-/-}.

4.2.3.3 Neurogenèse et survie des neurones néoformés du gyrus denté

Nous avons vu auparavant que la première étape de la neurogenèse adulte hippocampale était spécifiquement altérée dans l'hippocampe. Nous avons voulu donc savoir si l'altération de la cytogénèse était accompagnée d'une diminution du nombre de neurones néoformés dans le gyrus denté. Pour cela, nous avons, comme pour le bulbe olfactif, comptabilisé le nombre neurones BrdU⁺/NeuN⁺, six semaines après injection. En analysant chaque coupe coronale d'hippocampe, nous observons un profil de neurogenèse très similaire à celui de la cytogénèse (figures 53B et 51E). Chez les souris S^{-/-}, le pic de neurogenèse est fortement affaibli sur toute sa largeur, comme pour la cytogénèse (figure 53B). Globalement ces résultats indiquent une réduction significative de 55% du nombre de neurones néoformés dans le gyrus denté des souris S^{-/-} (figure 53C : S^{+/+} : 340 cellules BrdU⁺/NeuN⁺, n = 4 ; S^{-/-} : 154 cellules BrdU⁺/NeuN⁺, n = 4 ; p < 0,05). Sachant qu'une gliogenèse est associée à la neurogenèse adulte hippocampale nous avons comptabilisé le nombre de cellules gliales néoformées S100B⁺/BrdU⁺. Le résultat de ce comptage n'indique aucune différence significative entre les animaux S^{+/+} et S^{-/-} (résultats non exposés). La réduction de neurogenèse n'est donc pas compensée par une augmentation de la gliogenèse chez les souris S^{-/-}.

4.2.3.4 Etude de la différenciation et de la maturation morphologique des neuroblastes du gyrus denté

Ces résultats nous indiquent que plusieurs étapes de la neurogenèse adulte hippocampale sont altérées chez la souris S^{-/-}. Cependant, la diminution de 33% de la cytogénèse ne peut pas entraîner, à elle seule, la réduction de 55% du nombre de neurones nouvellement générés. Il y a donc sûrement d'autres étapes de la neurogenèse adulte qui sont altérées. L'addition de ces altérations progressives permettraient alors d'obtenir une telle perte de neurones au niveau du gyrus denté, comme observé chez les souris S^{-/-}. Sachant que la protéine STOP, au sein du gyrus denté, est exprimée par les neurones en cours de maturation, les protéines STOP pourraient avoir un rôle intrinsèque dans la différenciation des neurones en cellules de grain matures. Il est donc important d'analyser les étapes intermédiaires de la neurogenèse adulte afin de déterminer quelles sont les déficiences qui viennent s'ajouter progressivement à l'altération de la cytogénèse. Nous pourrions alors approfondir l'implication de la protéine STOP dans la neurogenèse adulte hippocampale.

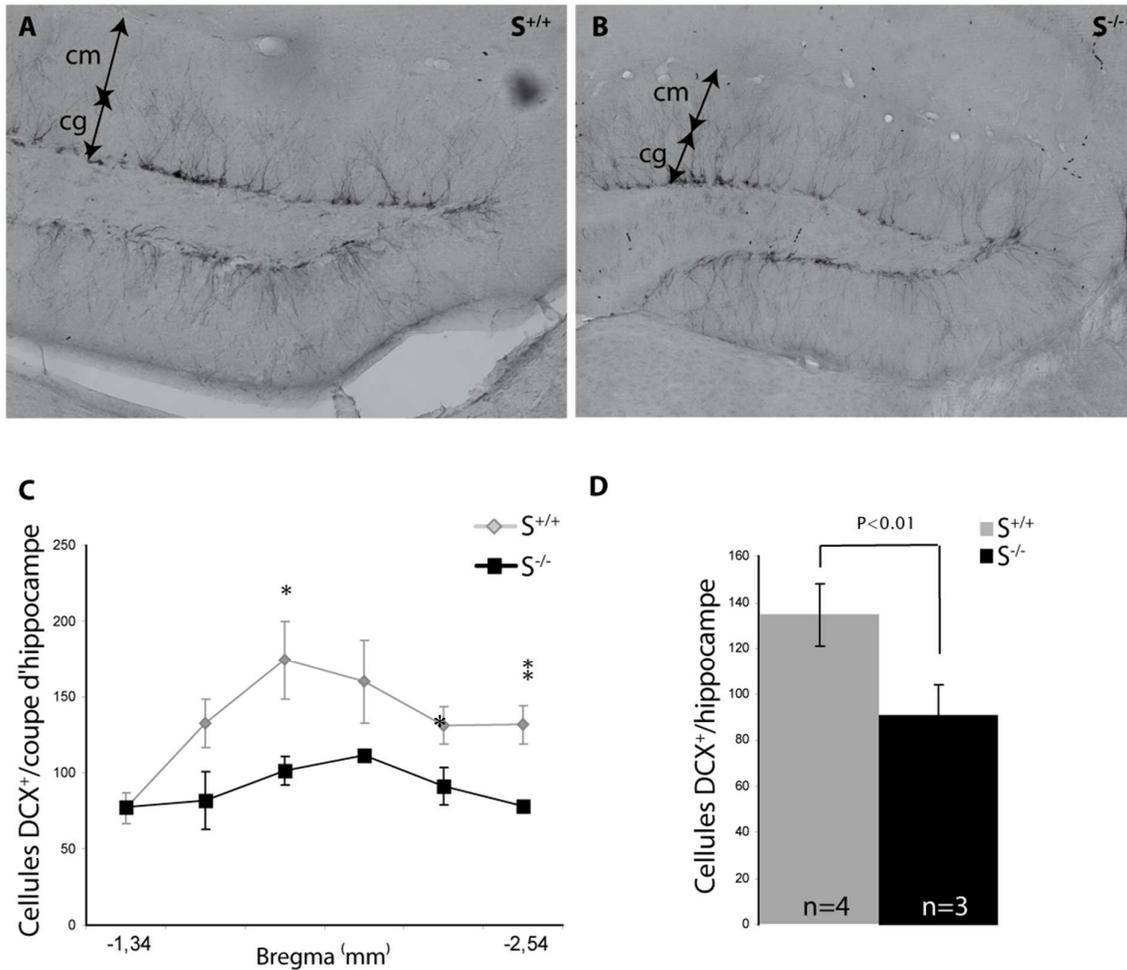


Figure 54 : Analyse du nombre de neuroblastes (DCX⁺) et neurones immatures néoformés dans le gyrus denté de souris sauvages (S^{+/+}) et invalidées (S^{-/-}).
A : Marquage des cellules DCX⁺ dans le gyrus denté de l'hippocampe sur coupe coronale de cerveau d'animal S^{+/+}. Observation au microscope optique x20. *cg* : couche granulaire, *cm* : couche moléculaire. **B :** Marquage des cellules DCX⁺ dans le gyrus denté de l'hippocampe sur coupe coronale de cerveau d'animal S^{-/-}. Observation au microscope optique x20. La densité de cellules DCX⁺ est significativement réduite chez les souris S^{-/-}. **C :** Représentation rostro-caudale du nombre moyen de cellules DCX⁺ de souris S^{+/+} et S^{-/-} nouvellement générés, sur chaque coupe d'hippocampe utilisée. * : p < 0,05, ** : p < 0,01. **D :** Histogramme de la moyenne des comptages de cellules DCX⁺ dans la zone granulaire du gyrus denté d'hippocampe de souris S^{+/+} et S^{-/-}.

Entre la cytogénèse et la maturation finale des neurones du gyrus denté à l'âge adulte (neurogenèse long terme) se déroulent la maturation morphologique et fonctionnelle des neurones immatures et l'apoptose terminale. Nous avons vu auparavant que la spécification neuronale ne semblait pas déficiente puisque la réduction du nombre de neurones créés n'est pas accompagnée d'une augmentation de la gliogénèse. Nous allons analyser le nombre de neuroblastes et de neurones immatures en comptabilisant le nombre de cellules exprimant la Doublecortine (DCX). La DCX est une MAP qui est exprimée transitoirement par les neuroblastes et les neurones immatures en cours de migration (cellules de types D1,

D2, et D3) (Gleeson et al., 1999; Friocourt et al., 2003). Elle est impliquée dans le transport intracellulaire des vésicules, la dynamique des microtubules, l'adhésion cellulaire et l'interaction MT/actine. Durant le développement, elle participe aux processus de migration neuronale mais aussi d'expansion neuritique.

La population cellulaire DCX⁺ retrouvée dans le gyrus denté de l'hippocampe englobe les trois types de neuroblastes (figure 23). Il est impossible de distinguer morphologiquement ces trois classes simplement par des marquages immunohistochimiques. La densité des cellules DCX⁺ dans la ZSG des souris S^{-/-} semble plus faible, comme l'indiquent les figures 54A et 54B. En effet, le comptage des corps cellulaires DCX⁺ nous indique une réduction significative de 40% du nombre de neuroblastes et de neurones immatures (figure 54D, S^{+/+} : 145,05 cellules DCX⁺, n = 4, S^{-/-} : 89,3 cellules DCX⁺, n = 3, p = 0,005). Le profil du nombre de cellules DCX⁺ des souris S^{+/+} et S^{-/-} selon l'axe antéropostérieur de l'hippocampe est équivalent à ceux observés pour la cytogénèse et la neurogénèse (figures 54C, 53B et 51E). Cette perte de 40% de cellules DCX⁺ est une valeur intermédiaire entre les valeurs de la cytogénèse (33%) et celle de la neurogénèse (55%).

Dans un deuxième temps, nous avons analysé la complexité de l'arborisation dendritique des cellules DCX⁺ présente dans la couche moléculaire du gyrus denté. D'après la littérature, ces prolongements dendritiques DCX⁺ appartiennent aux neurones immatures de type 3. Pour cette étude, nous avons tout d'abord comptabilisé le nombre de prolongements DCX⁺ à trois niveaux du gyrus denté (figure 55A et matériel et méthodes). Ces comptages nous indiquent que quelque soit le niveau de coupe analysé, le nombre de prolongements est spécifiquement et significativement réduit de 22% au niveau 1 chez les souris S^{-/-} par rapport aux souris S^{+/+} (figure 55Ba, p < 0,01). Ce niveau correspond à l'interface entre la couche granulaire et la couche moléculaire. En observant plus en détail les embranchements dendritiques des neurones immatures sur la figure 55A, nous pouvons remarquer une nette différence de morphologie entre souris S^{+/+} et S^{-/-} : en effet, les neurones des souris S^{+/+} ont déjà commencé à développer une arborisation très dense au sein de la couche granulaire alors que les dendrites primaires des neurones des souris S^{-/-} ne sont toujours pas ramifiés. Ce constat nous a alors amenés à analyser le profil d'arborisation dendritique de ces neurones au niveau de la couche moléculaire. Pour cela, nous avons calculé des rapports entre le nombre de prolongements au niveau 2 et au niveau 1, puis entre le nombre de prolongements au niveau 3 et au niveau 2. L'analyse des ratios nous indique que la quantité de branchements dendritiques des neurones de souris S^{+/+} reste homogène (figure 55Ca : S^{+/+} : ratio niveau 2/niveau 1 : 95%, figure 55Cb : ratio niveau 3/niveau 2 : 80%, n = 4), alors qu'il y a une prolifération dendritique significativement très importante au niveau 2 dans les neurones des souris S^{-/-} (figure 55Cb, S^{-/-} : ratio niveau

2/niveau 1 : 135%, $p < 0,001$, $n = 3$). Ces données suggèrent que les neurones immatures des souris $S^{-/-}$ auraient une morphologie dendritique très différente de celle des souris $S^{+/+}$. En effet, il semblerait que les neurones immatures des souris $S^{-/-}$ aient un dendrite primaire plus long et un arbre dendritique plus branché que les neurones de souris $S^{+/+}$.

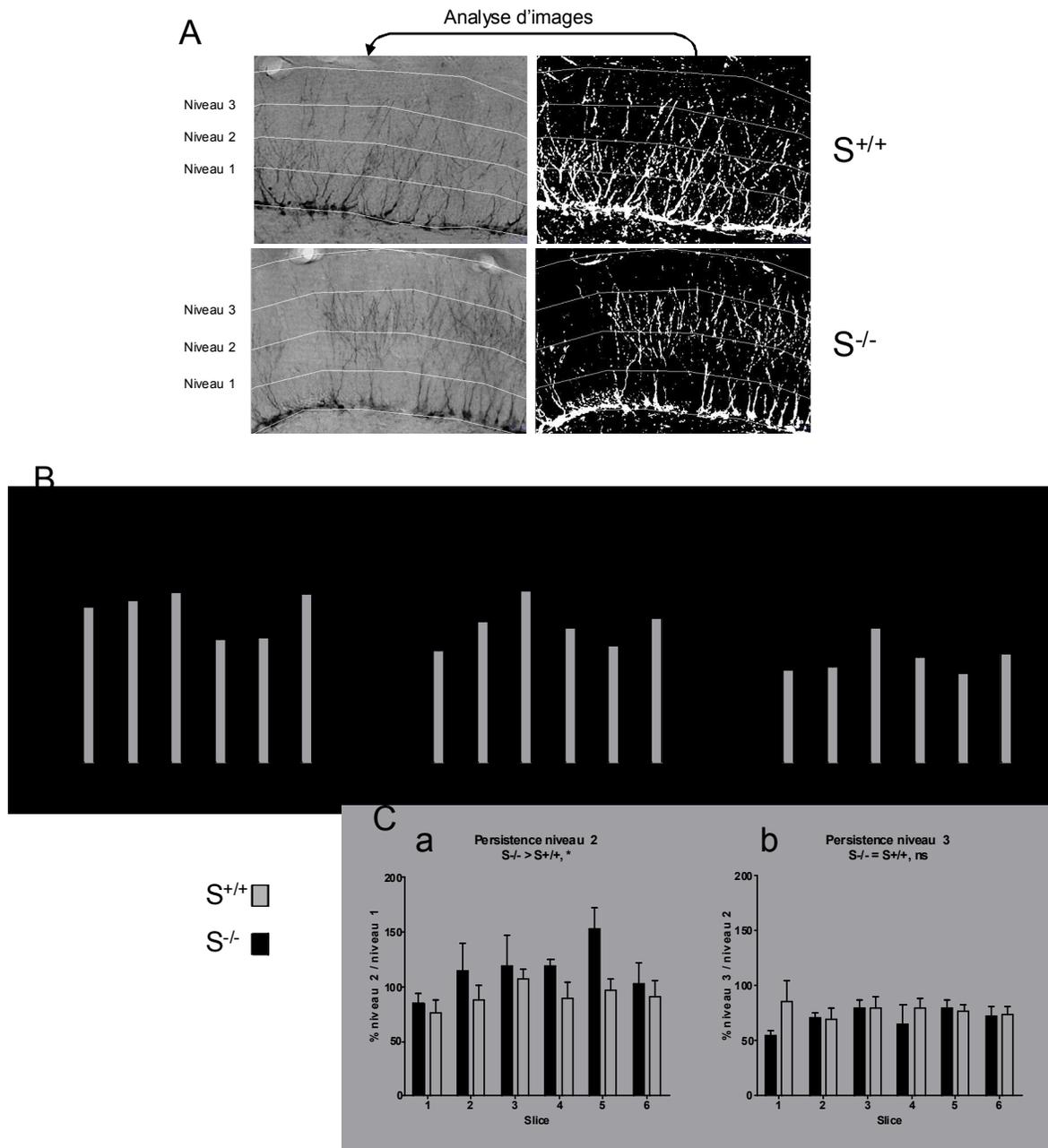


Figure 55 : Analyse du nombre et de la persistance des prolongements dendritiques des neurones immatures du gyrus denté de souris sauvages ($S^{+/+}$) et invalidées ($S^{-/-}$).

A : schématisation de la technique de comptage du nombre de branchements des cellules DCX^{+} des souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ sur 3 niveaux : *niveau 1* : limite couche granulaire/couche moléculaire, *niveaux 2 et 3* : lignes imaginaires séparant en 3 parties égales la couche moléculaire du gyrus denté. **B :** Histogrammes représentatifs du nombre de prolongements DCX^{+} sur le niveau 1 (**a**), niveau 2 (**b**) et le niveau 3 (**c**). **C :** Histogrammes représentatifs de la persistance des prolongements entre les niveaux 2 et 1 (**a**) et entre les niveaux 3 et 2 (**b**), pour chaque coupe de cerveau de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$. La persistance est calculée en effectuant le rapport entre le nombre de prolongements au niveau 2 et nombre au niveau 1 ou bien le rapport entre le nombre de prolongements au niveau 3 et le nombre au niveau 2.

4.2.3.5 Analyse de la différenciation morphologique des neurones néoformés par infection rétrovirale

L'augmentation de l'arborisation dendritiques des neurones immatures DCX⁺ chez les souris S^{-/-} suggère fortement une morphologie différente chez ces neurones. Ces différences d'arborisation peuvent traduire une altération dans les étapes de différenciation et maturation morphologique de ces cellules. Afin de suivre ces étapes, nous avons commencé à développer les techniques d'infection rétrovirale des cellules souches/progénitrices de la ZSG. Le rétrovirus pQCXIP- GFP dont nous nous sommes servis est un virus à ARN⁺, répliquatif (figure 57A) qui est capable d'infecter spécifiquement les cellules en cours de division. Ainsi, une fois injecté par chirurgie stéréotaxique dans la ZSG du gyrus denté, le virus va aller infecter de façon spécifique les cellules souches et les progéniteurs proliférant. Il utilisera ensuite sa rétrotranscriptase afin de synthétiser un ADNc à partir de son ARN, afin de s'incorporer dans l'ADN de sa cellule hôte. Ainsi, une cellule infectée exprimera de façon constitutive la GFP et sera facilement détectable en microscopie à fluorescence parmi les autres cellules. Vu que le génome viral s'incorporera de façon irréversible (identique à un rétrotransposon), toutes les cellules descendant d'une cellule souche infectée (neuroblaste, neurone ou astrocyte) exprimera aussi la GFP.

- ***Infection rétrovirale de culture de neurones primaires d'hippocampe de souris***

Avant d'utiliser le virus sur animal vivant, nous avons voulu vérifier la spécificité d'infection de notre rétrovirus. Nous avons alors infecté une culture primaire de neurones d'hippocampe total, âgée de 24 heures, d'embryons de souris E17.5 avec la suspension rétrovirale.

Nous voyons tout d'abord que 24 h post-infection, aucun neurone exprimant la β III tubuline n'est infecté (figures 56A, 56C, 56D et 56F). La GFP n'est exprimée que par des cellules morphologiquement indifférenciées (figures 56A et 56D, flèches blanches), exprimant des marqueurs de cellules progénitrices et de cellules souches que sont RC2 (Nestine) et NG2 (marqueurs de progéniteurs oligodendrocytaires) (figures 56B, 56C, 56E et 56F).

A une semaine de culture, la GFP se retrouve très majoritairement dans les astrocytes GFAP⁺ (figures 56G et 56I, flèches blanches) et dans quelques neurones β III tubuline⁺ (figures 56G et 56I, flèches jaunes). Après deux semaines de culture, nous pouvons voir apparaître des oligodendrocytes MBP⁺ exprimant la GFP (figures 56J, 56K et 56L).

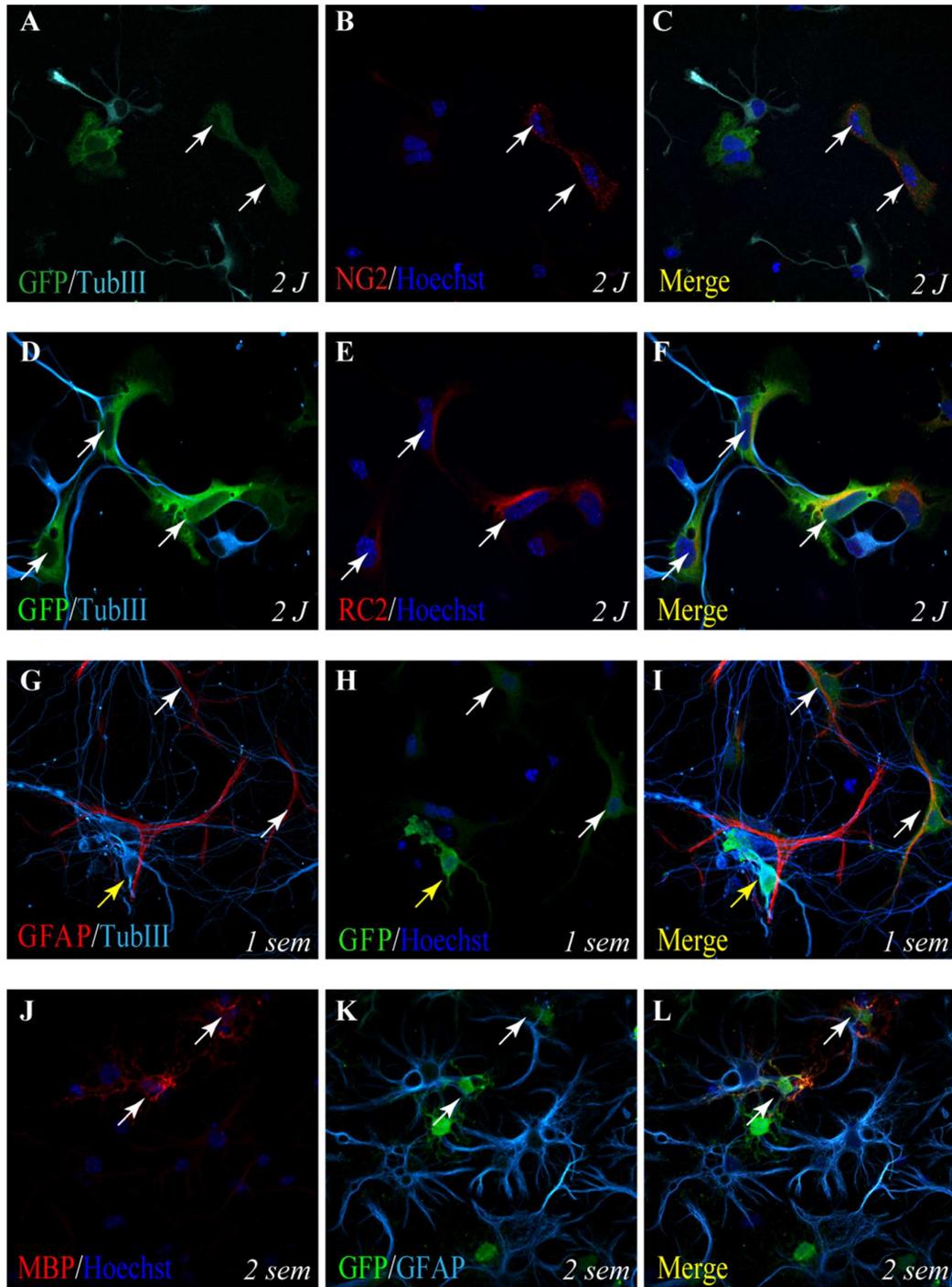


Figure 56 : Analyse, par immunofluorescence, du patron d'infection du rétrovirus-GFP d'une culture primaire d'hippocampe d'embryons de souris à différents temps post-infection.

A-F : analyse par immunofluorescence du type de cellules GFP⁺ (↗) au bout 2 jours (2J) d'infection. *GFP* : Green Fluorescent Protein ; *NG2* : caractérise les précurseurs oligodendrocytaires ; *RC2* : Radial glial Cells 2, antigène exprimé par les cellules souches neurales ; *tub III* : tubuline III, spécifique des neurones matures ; *Merge* : superposition des 2 images. G-I : analyse par immunofluorescence du type de cellules GFP⁺ (↗) au bout d'une semaine (1 sem) d'infection. *GFAP* : Glial Fibrillary Acid Protein, spécifique des astrocytes (↗) ; (↗) : neurones exprimant la GFP. J-L : analyse par immunofluorescence du type de cellules GFP⁺ (↗) au bout 2 semaines (2 sem) d'infection. *MBP* : Myelin Basic Protein, spécifique des oligodendrocytes.

Ces résultats nous confirment donc l'efficacité de notre rétrovirus à infecter uniquement des cellules souches/progénitrices, capables de se différencier ensuite en neurones, astrocytes et oligodendrocytes matures.

- ***Infection rétrovirale des cellules souches/progénitrices de la zone sous granulaire***

Nous avons effectué des injections stéréotaxiques intracrâniennes de rétrovirus au sein du gyrus denté droite et gauche de souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$ (figure 57B), et suivi le devenir des cellules infectées (exprimant la GFP) après 2 et 4 semaines d'infection, période à laquelle, durant le processus de neurogenèse adulte, se produit la différenciation des neuroblastes en neurones immatures puis matures.

A deux semaines post-infection rétrovirale, les cellules du gyrus denté exprimant la GFP, présentent un corps cellulaire rond et émettent un prolongement traversant la couche granulaire du gyrus denté, typiques de neuroblastes en cours de maturation (figure 57Ca). Elles se trouvent juste à la jonction entre la ZSG et la couche granulaire et expriment toutes la DCX, montrant qu'elles sont déjà spécifiées au devenir neuronal (figure 57Cb). Nous pouvons aussi observer que les cellules GFP^+ , à 2 semaines d'infection, n'expriment que très rarement NeuN (figure 57Cc). A quatre semaines d'infection, correspondant en fait à la fin de la phase de maturation morphologique des neurones en grain, certaines cellules GFP^+ présentent un corps cellulaire en forme de grain, ainsi qu'une fine arborisation s'étendant jusqu'à la couche moléculaire du gyrus denté, faisant penser à un neurone granulaire différencié. En effet, nous pouvons voir dans les figures 57Da et 57Db que la plupart de ces cellules n'expriment plus la DCX mais NeuN. Ces cellules GFP^+ sont donc des neurones granulaires matures. Malgré un nombre insuffisant de souris, nous avons quantifié le nombre de cellules $GFP^+/NeuN^+/DCX^+$ et $GFP^+/NeuN^+/DCX^-$ à 4 semaines post-infection chez les souris $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$. Sur les 12 cellules GFP^+ analysées chez les souris $S^{+/+}$, 5 cellules présentent une immunoréactivité pour DCX (figure 57E) alors qu'aucune cellule DCX^+/GFP^+ n'est détectable chez les souris $S^{-/-}$ (figure 57E). Ces résultats, tout à fait préliminaires, nous indiquent qu'il pourrait y avoir une précocité de la maturation neuronale chez les souris $S^{-/-}$.

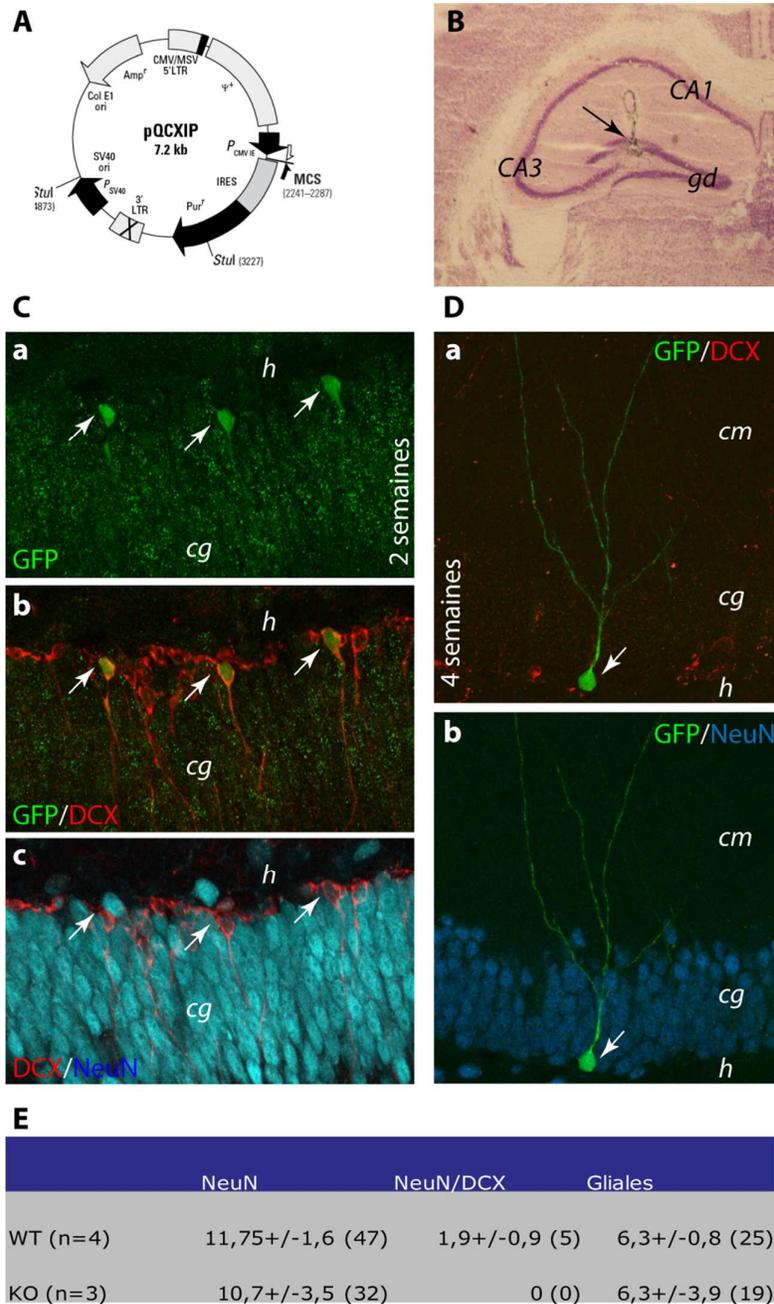


Figure 57 : Etude de la cinétique de la maturation des neurones immatures néoformés dans le gyrus denté des souris sauvages ($S^{+/+}$) et invalidées ($S^{-/-}$) par infection rétrovirale-GFP.

A : cartographie de la séquence génomique du rétrovirus utilisé. **B** : photographie représentative du site d'injection stéréotaxique du rétrovirus, par de l'encre de chine (☞), dans le gyrus denté. *gd* : gyrus denté, *CA3* : Corne d'Ammon 3, *CA1* : Corne d'Ammon 1. **C** : **a-c** : analyse par immunofluorescence des types cellulaires infectés (GFP^+) après 2 semaines d'infection rétrovirale stéréotaxique des animaux. *cg* : couche granulaire ; *h* : hilus ; *GFP* : Green Fluorescent Protein, *DCX* : Double Cortine X, spécifique des neuroblastes et neurones immatures ; *NeuN* : Neuronal Nuclear protein, spécifique des neurones immatures et matures. **D** : **a** et **b** : analyse par immunofluorescence des types cellulaires infectés (GFP^+) après 4 semaines d'infection rétrovirale stéréotaxique des animaux. **E** : tableau récapitulatif des comptages préliminaires du nombre de neurones immatures ($GFP^+/NeuN^+/DCX^+$) et matures ($GFP^+/NeuN^+/DCX^-$) retrouvés dans la zone granulaire après quatre semaines d'infection rétrovirale des animaux $S^{+/+}$ et $S^{-/-}$.

Cependant, cette première étude ne nous permet pas d'effectuer une analyse morphométrique du réseau dendritique des neurones néoformés. En effet, le niveau d'expression de la GFP dans la plupart des cellules, à l'exception de l'image montrée dans les figures 57Da et b, ne permet pas une visualisation complète du réseau dendritique. Comme le montre la figure 57Da et b, l'immunoréactivité de la GFP se restreint principalement au corps cellulaire. Nous avons même l'impression que l'intensité d'immunoréactivité a diminué entre deux semaines et quatre semaines. Il nous faudra, pour les prochaines études rétrovirales, utiliser un rétrovirus dont l'expression de la GFP est beaucoup plus robuste dans le temps.

4.2.4 Discussion

La neurogenèse a fait l'objet de nombreuses recherches chez les patients et les modèles murins atteints de troubles comportementaux apparentés à la schizophrénie et la dépression. La schizophrénie est souvent caractérisée comme une maladie de la connectivité et de la maturation neuronale. Nous avons vu dans la première partie que les souris $S^{-/-}$ souffraient d'un important déficit axonal renforcé par l'absence de la partie post-commissurale du fornix, une des voies majeures de sortie de l'hippocampe. De plus, les données obtenues sur les neurones sérotoninergiques projetant sur le gyrus denté nous indiquent une très forte réduction du nombre de fibres sérotoninergiques dans le gyrus denté des souris KO STOP. Or, de nombreuses études ont montré l'implication de la sérotonine dans la régulation de la neurogenèse adulte. Par ailleurs, la neurogenèse adulte joue un rôle dans l'apprentissage et la mémoire hippocampe-dépendant, déficients chez les souris $S^{-/-}$. Tous ces arguments nous ont amenés à analyser la neurogenèse adulte dans les souris KO STOP. Nos résultats montrent clairement une altération spécifique de la neurogenèse hippocampale adulte corrélant avec les défauts de connectivité synaptique et les troubles comportementaux des souris $S^{-/-}$. Par ailleurs, nous avons pu montrer une forte association entre l'expression de la protéine STOP et l'altération des étapes de différenciation morphologique des neurones immatures néoformés de l'hippocampe. L'absence de défauts de la neurogenèse sous ventriculaire, qui elle, est dépourvue de protéine STOP, renforce l'hypothèse du rôle direct de la protéine STOP dans les processus de maturation des neurones en grain du gyrus denté. Dans un deuxième temps, nous avons focalisé notre étude sur les différentes étapes de différenciation et maturation morphologique des neurones néoformés du gyrus denté, en développant des techniques de traçage rétroviral.

Par ailleurs, la connectivité neuronale entre les régions du cerveau des souris $S^{-/-}$ semble donc altérée. En outre, ce phénomène dépend finement de la qualité de la maturation neuronale. Nous avons utilisé le processus de neurogenèse adulte afin de

comprendre quels pourraient être les déficiences de maturation neuronale qu'aurait la souris $S^{-/-}$, et par la même occasion, approfondir le rôle des protéines STOP dans les processus de maturation neuronale.

4.2.4.1 Cytogenèse hippocampale et régulations extrinsèques

La prolifération des cellules progénitrices diminue de 30% environ chez les souris $S^{-/-}$ et ce, quelque soit le fond génétique utilisé (129/Balbc et 129/C57Bl6). Par ailleurs, les cellules progénitrices du gyrus denté sont dépourvues de protéines N- et E- STOP. Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses concernant l'impact de l'absence de STOP sur la déficience de régulation extrinsèque de la cytotogenèse hippocampale des souris $S^{-/-}$. Tout d'abord, la réduction de la cytotogenèse pourrait provenir d'une diminution du nombre de cellules souches chez les souris $S^{-/-}$. Or, nous avons comptabilisé le nombre de clusters de cellules BrdU+ (correspondant en fait à la division clonale d'un progéniteur) sur les coupes utilisées pour l'analyse de la cytotogenèse, et le nombre de ces clusters reste équivalent entre les deux génotypes. L'absence de STOP dans les souris $S^{-/-}$ pourrait aussi rendre l'environnement cellulaire et moléculaire des cellules souches/progéniteurs du gyrus denté non permissif à leur prolifération. Des recherches ont révélé que certaines voies de signalisation impliquées dans l'activation de la prolifération de ces cellules étaient souvent dérégulées dans des modèles animaux de schizophrénie (De Ferrari and Moon, 2006; Lachman et al., 2007; Toro and Deakin, 2007). Nous savons aussi que les processus impliqués dans la plasticité synaptique (LTP des collatérales de Shaeffer, LTP des fibres moussues), l'activité hippocampale ainsi que la signalisation glutamatergique, tous altérés chez la souris $S^{-/-}$ (Brun et al., 2005; Andrieux et al., 2006), potentialisent la prolifération des cellules souches (Bruehl-Jungerman et al., 2006; Joo et al., 2007). Par ailleurs, les facteurs trophiques comme le BDNF, la sérotonine et les neurotrophines ont aussi un effet positif sur la cytotogenèse (Abrous et al., 2005). Nous savons que le nombre de fibres sérotoninergiques est réduit au niveau du gyrus denté de l'hippocampe et dans la ZSV des souris $S^{-/-}$. Par ailleurs, nous avons montré que la neurogenèse adulte de la ZSV, aboutissant à la naissance de neurones au niveau du bulbe olfactif, n'était pas déficiente chez la souris $S^{-/-}$. De plus, les cellules impliquées dans le processus de neurogenèse olfactive sont toutes dépourvues de protéines STOP. Ceci laisse penser que la sérotonine et la protéine STOP n'interviendraient pas dans la régulation de la neurogenèse adulte olfactive. Dans le gyrus denté, il pourrait en être autrement : nous savons que la sérotonine a un effet potentiel dans la régulation de la prolifération des astrocytes germinatifs du gyrus denté adulte alors que son rôle dans la ZSV reste encore controversé (Abrous et al., 2005). Le fait que la neurogenèse adulte hippocampale soit altérée dans les souris KO STOP et associée à

l'absence à la fois de STOP et de la signalisation sérétoninergique dans cette région pourrait suggérer que la protéine STOP jouerait un rôle médiateur dans la voie de régulation de la sérotonine sur la neurogenèse adulte.

Nous avons aussi vu que la quantité de BDNF au sein de l'hippocampe des souris $S^{-/-}$ n'était pas significativement différente des souris $S^{+/+}$. Cela n'enlève pas l'éventualité d'une dysfonction de la voie BDNF. Il serait alors judicieux d'analyser son intégrité en dosant, par western blot par exemple, les quantités de GSK3 β , une protéine adaptatrice impliquée à la fois dans la voie de signalisation BDNF et de la sérotonine (Deltheil et al., 2008; Kriegebaum et al., 2010), mais aussi des récepteurs au BDNF, Trk B. Nous pourrions aussi étudier le transport neuritique des récepteurs Trk B dans les neurones en grain et les cellules progénitrices ainsi que leur maturation (phosphorylation des récepteurs nécessaire à leur ancrage dans la membrane plasmique). Notre laboratoire a montré très récemment, lors d'une étude préliminaire, que la maturation des récepteurs Trk B de neurones hippocampaux de souris $S^{-/-}$ en culture était déficiente (Laetitia Peris, communication personnelle).

Nous pensons fortement que la baisse de cytogénèse ne soit pas seule responsable de la diminution de la neurogenèse *in fine*. En effet, nous montrons que le processus de neurogenèse hippocampale est progressivement altéré au fur et à mesure des étapes. Si la diminution du nombre de neurones néoformés provenait seulement de la baisse de cytogénèse, nous aurions 30% de neurones néoformés en moins au niveau du gyrus denté. Or nous en avons presque 55% en moins. Afin de vérifier la capacité des cellules souches à se diviser et à donner des neurones, nous pourrions alors, effectuer des cultures, *in vitro*, de ces cellules. Il est, en effet, possible de cultiver des cellules souches neurales *in vitro* en utilisant un cocktail spécifique de facteurs de croissance. Ces unités de prolifération sont appelées neurosphères. Ces neurosphères sont aussi capables de se différencier en neurones et astrocytes, comme dans le gyrus denté. S'il y a réellement une déficience de l'environnement cellulaire des cellules souches neurales dans le gyrus denté, cultiver des neurosphères et les faire différencier serait un moyen de « by-passer » les déficiences extrinsèques et d'analyser réellement l'intégrité du processus (et voir s'il y a des déficiences intrinsèques).

4.2.4.2 Maturation neuronale, protéines STOP et stabilisation microtubulaire

Nous avons ensuite montré que chez la souris $S^{-/-}$, le nombre de neuroblastes (DCX $^{+}$) en cours de différenciation diminuait de 40%. Ceci peut s'expliquer soit par une différenciation plus précoce qui réduirait alors le temps d'expression transitoire de la DCX dans ces cellules, soit par une mort neuronale des neuroblastes plus importante. En effet, le devenir naturel des neuroblastes est la mort cellulaire (40% des neuroblastes néoformés

sont voués à mourir) (Kempermann et al., 2004b; Kempermann et al., 2004a). Seuls les neuroblastes fonctionnels et répondant aux facteurs trophiques pourront maturer et s'intégrer. Afin de vérifier que cette diminution du nombre de neuroblastes n'est pas due à une apoptose plus importante, nous allons appliquer la technique du TUNEL combinée à un marquage des cellules DCX⁺ et comptabiliser ainsi le taux d'apoptose des neuroblastes chez les souris S^{+/+} et S^{-/-}.

L'hypothèse que nous soutenons actuellement serait un défaut de maturation des neuroblastes, ce qui expliquerait la diminution de 55% du nombre de neurones néoformés chez la souris S^{-/-}. En effet, nous avons analysé le profil dendritique de ces neuroblastes au sein de la couche moléculaire du gyrus denté et les dendrites de ces neurones immatures semblent plus branchées chez les souris S^{-/-}. L'analyse du patron d'expression des protéines STOP des neuroblastes, neurones immatures et matures du gyrus denté montre que les neuroblastes DCX⁺ n'expriment pas la protéine STOP. La protéine STOP est cependant retrouvée dans les cellules DCX⁺ exprimant faiblement la protéine NeuN⁺ (spécifique des neurones immatures et matures), indiquant que la protéine STOP apparaît dans les neurones en cours de maturation. Un neuroblaste est considéré comme un neurone immature dès qu'il a développé son dendrite primaire. Ainsi la diminution du nombre de cellules DCX⁺ observée chez les souris S^{-/-} et le fait que leur arbre dendritique soit plus développé nous fait penser à une précocité de maturation neuronale (en tout cas morphologique). Cette hypothèse est de plus confortée par les résultats préliminaires obtenus sur la cinétique de maturation des neuroblastes effectuée par infection rétrovirale des cellules progénitrices. Nous avons comptabilisé le nombre de neurones immatures (GFP⁺/NeuN⁺/DCX⁺) et de neurones matures (GFP⁺/NeuN⁺/DCX⁻) après 4 semaines d'infection des cellules souches, période qui correspond à la phase de maturation neuronale. Alors que chez les souris sauvages nous retrouvons à la fois des neurones matures et immatures, chez les souris S^{-/-} nous n'avons comptabilisé aucun neurone immature (DCX⁺/GFP⁺). Cette étude est préliminaire et demande à être validée sur un nombre plus important d'animaux, afin d'effectuer un test statistique. Nos résultats vont donc en faveur d'une maturation précoce des neurones chez les souris S^{-/-}. Nos résultats pourraient être complétés par une étude plus poussée de l'architecture neuritique des neurones néoformés de souris S^{-/-}. Nous avons un outil très efficace pour effectuer ce travail qui est le rétrovirus que nous avons utilisé pour la cinétique de maturation des neurones en formation. Cependant, l'expression de la GFP semble s'amoinrir au fur et à mesure des semaines et il est difficile d'analyser l'architecture entière d'un neurone après 6 semaines d'infection rétrovirale. La GFP reste dans le corps cellulaire du neurone et n'est que peu transportée dans les neurites. Il nous faudra donc utiliser un autre rétrovirus dont l'expression de la GFP

sera plus stable. Avec un marquage GFP nous pourrions alors analyser l'architecture axonale et dendritique des neurones immatures en microscopie confocale et effectuer des statistiques qui appuieraient les observations architecturales (nombre d'épines dendritiques, forme des épines, longueur de la dendrite primaire, nombre d'embranchements, longueur axonale, nombre de ramifications axonales). Il sera aussi judicieux d'analyser l'architecture des fibres moussues. En effet, ces fibres correspondant aux axones des neurones granulaires qui viennent connecter les dendrites des neurones de la CA3, sont le centre de nombreuses études visant à montrer leur implication dans les troubles de la mémoire et l'apprentissage observés chez les patients schizophrènes (Kobayashi, 2009). De plus, il a été montré au laboratoire que les neurones hippocampaux en culture présentaient une polarisation axonale précoce (Jacques Brocard, communication personnelle). L'analyse de l'intégrité du compartiment axonal des neurones en formation nous renseignerait alors sur l'implication de la protéine STOP dans le développement axonal et dendritique.

L'analyse des différentes phases de la NGA chez la souris $S^{-/-}$ nous permet, d'une façon indirecte, d'approfondir le rôle de la protéine STOP dans le processus de maturation neuronale. Nous pourrions alors, à l'aide d'un rétrovirus éteindre l'expression de la protéine STOP dans les cellules progénitrices hippocampales de souris sauvages (séquences d'ARN interférents spécifiques des STOP incluses dans la séquence génomique rétrovirale) et ainsi analyser ces différentes phases. De la même manière, nous pourrions rétablir l'expression de la protéine STOP dans les cellules progénitrices de gyrus denté de souris $S^{-/-}$. Ces deux expériences nous permettraient de mieux appréhender, d'une part, le rôle intrinsèque des protéines STOP dans la maturation neuronale, et d'autre part, l'implication de l'environnement extrinsèque $S^{-/-}$ dans la régulation des phases de maturation neuronale.

Afin de savoir si l'altération de la NGA proviendrait d'une déstabilisation microtubulaire médiée par l'absence de la protéine STOP, nous pourrions alors traiter des souris sauvages et $S^{-/-}$ aux épothilones D et analyser ensuite la maturation des neurones hippocampaux. Cette molécule est reconnue pour stabiliser les microtubules et diminuer certains des troubles positifs chez les souris $S^{-/-}$ (Andrieux et al., 2006).

4.2.4.3 Survie neuronale et plasticité synaptique

Nous avons aussi vu que le nombre de neurones néoformés dans le gyrus denté des souris $S^{-/-}$, *in fine*, était diminué de 55%. Ceci nous indique que s'il y a une réelle maturation précoce des neurones, elle serait cependant délétaire. Il est d'ailleurs connu que la plasticité synaptique des dendrites des neurones du gyrus denté est déficiente chez les souris $S^{-/-}$ (Andrieux et al., 2002). Au moment de la maturation fonctionnelle des neurones en grain, leur survie est compétitive et dépend de leur capacité à la fois réagir aux stimuli environnants

en émettant des potentiels d'actions, et à la fois exprimer des sous unités de récepteurs spécifiques, comme la sous unité du récepteur au glutamate NR₁ (Tashiro et al., 2006). Afin de savoir si les neurones nouvellement générés souffriraient, chez la souris S^{-/-}, de défauts synaptiques, il faudrait procéder à une analyse électrophysiologique de ces neurones à l'aide de techniques comme le patch clamp combiné à une infection rétrovirale du gyrus denté afin de distinguer les nouveaux neurones des anciens.

4.2.4.4 Neurogenèse adulte et schizophrénie

L'étude de la neurogenèse adulte hippocampale fait partie d'un projet visant à déterminer l'origine et les conséquences des défauts de neuroplasticité hippocampale dans la mise en place de la physiopathologie des souris S^{-/-}. En fait, nous voudrions savoir si la neurogenèse adulte pourrait participer aux défauts de plasticité synaptique observés chez ces souris.

S'il est maintenant bien établi que les antidépresseurs stimulent la neurogenèse hippocampale, l'effet des neuroleptiques reste encore controversé. Afin d'approfondir l'éventuel rôle de la NGA dans la mise en place de la physiopathologie des souris S^{-/-} et/ou dans la déficience des processus de plasticité synaptique hippocampale, il serait judicieux de traiter, à long terme, les souris S^{-/-} aux neuroleptiques et antipsychotiques (halopéridol, rispéridal...) ou effectuer des ECT (électrochocs, connus pour stimuler la NGA) et observer l'éventuel retour à la normal d'une ou des phases de la NGA. Dans le cas où les traitements auraient un effet positif sur la NGA, il faudrait aussi analyser à quel moment se fait l'atténuation des symptômes comportementaux et des défauts de plasticité synaptique par rapport au retour à la normal de la NGA. Nous pourrions alors déterminer le niveau d'implication de la NGA dans la mise en place de la physiopathologie des souris S^{-/-}.

5 Conclusion générale

Un des axes majeur de notre laboratoire est l'étude de la mise en place de la physiopathologie de la schizophrénie à travers la compréhension de l'origine des troubles comportementaux présentés par le modèle murin de schizophrénie, développé au laboratoire, la souris KO STOP ($S^{-/-}$). Nous avons montré que la réduction du volume cérébral des souris $S^{-/-}$ était la conséquence d'une diminution drastique du neuropil axonal et de la substance blanche. Ces résultats ont été accentués par la mise en évidence pour la première fois, dans notre modèle animal, d'un phénotype cellulaire majeur qu'est la disparition totale de la partie post-commissurale du fornix, un tract myélinisé faisant partie du système limbique, dont la surface est aussi diminuée chez les patients schizophrènes humains. Nos résultats de traçage du fornix chez ces souris ne nous ont pas encore permis de comprendre si cette absence est d'origine neurodégénérative ou neurodéveloppementale, mais dénotent cependant des troubles de connectivités neuronales importants. Nous pensons fortement que l'absence de ce tract chez ces souris serait due à une altération du processus de croissance neuritique directement reliée à l'absence de la protéine STOP. Comprendre alors l'origine de ce phénotype nous permettrait de mieux appréhender le rôle des protéines STOP dans la maturation neuronale et par la même occasion l'origine des troubles de connectivité retrouvés dans la schizophrénie.

Nous avons le moyen d'analyser, dans le cerveau adulte de rongeur, les différentes étapes de la maturation neuronale à travers le processus de neurogenèse adulte hippocampale, qui permet la création de neurones à l'âge adulte. Ce processus semble aussi jouer un rôle dans les processus d'apprentissage et de mémorisation, qui sont, par ailleurs, altérés chez les patients schizophrènes. Nous avons démontré une altération progressive du processus de neurogenèse adulte chez la souris $S^{-/-}$ aboutissant à une diminution massive du nombre de neurones néoformés. Sachant que la protéine STOP apparaît dans les neurones en cours de maturation, l'effet cumulatif suggère un rôle intrinsèque des protéines STOP dans la différenciation des neurones des cellules en grain du gyrus denté de l'hippocampe. Nous avons montré que la maturation morphologique des neurones en grain pourrait se faire plus précocement chez les souris $S^{-/-}$ et aboutirait, au final, à la création de neurones déficients.

Cette étude a donc permis de conforter le statut de modèle animal de schizophrénie des souris $S^{-/-}$ en mettant en évidence pour la première fois dans un modèle murin, un phénotype cellulaire majeur retrouvé aussi chez les patients schizophrènes humains. Dans ce contexte, il apparaît que la souris $S^{-/-}$ est un bon modèle expérimental pour déterminer les bases cellulaires de la perte de masse cérébrale et de la neurogenèse adulte associées aux

symptômes schizophréniques. Ce travail ouvre aussi de nombreuses hypothèses sur le rôle des protéines STOP dans la maturation neuronale (guidance axonale et maturation morphologique) et plus généralement dans la mise en place des connectivités neuronales.

6 BIBLIOGRAPHIE

- Aberg MA, Aberg ND, Hedbacker H, Oscarsson J, Eriksson PS (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:2896-2903.
- Abi-Dargham A, Mawlawi O, Lombardo I, Gil R, Martinez D, Huang Y, Hwang DR, Keilp J, Kochan L, Van Heertum R, Gorman JM, Laruelle M (2002) Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J Neurosci* 22:3708-3719.
- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85:523-569.
- Aguezoul M, Andrieux A, Denarier E (2003) Overlap of promoter and coding sequences in the mouse STOP gene (Mtap6). *Genomics* 81:623-627.
- Akbarian S, Vinuela A, Kim JJ, Potkin SG, Bunney WE, Jr., Jones EG (1993a) Distorted distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase neurons in temporal lobe of schizophrenics implies anomalous cortical development. *Arch Gen Psychiatry* 50:178-187.
- Akbarian S, Bunney WE, Jr., Potkin SG, Wigal SB, Hagman JO, Sandman CA, Jones EG (1993b) Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. *Arch Gen Psychiatry* 50:169-177.
- Akhmanova A, Steinmetz MO (2008) Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:309-322.
- Akimoto J, Itoh H, Miwa T, Ikeda K (1993) Immunohistochemical study of glutamine synthetase expression in early glial development. *Brain Res Dev Brain Res* 72:9-14.
- Alexander JE, Hunt DF, Lee MK, Shabanowitz J, Michel H, Berlin SC, MacDonald TL, Sundberg RJ, Rebhun LI, Frankfurter A (1991) Characterization of posttranslational modifications in neuron-specific class III beta-tubulin by mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4685-4689.
- Altman J (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol* 136:269-293.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.
- Altman J, Bayer SA (1990) Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of dentate granule cells. *J Comp Neurol* 301:325-342.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Alvarez-Buylla A, Theelen M, Nottebohm F (1990) Proliferation "hot spots" in adult avian ventricular zone reveal radial cell division. *Neuron* 5:101-109.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2:287-293.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Mateo AS, Merchant-Larios H (1998) Primary neural precursors and intermitotic nuclear migration in the ventricular zone of adult canaries. *J Neurosci* 18:1020-1037.
- Ambrogini P, Lattanzi D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V, Santi S, Cuppini R (2004) Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 1017:21-31.
- Andreasen NC, Paradiso S, O'Leary DS (1998) "Cognitive dysmetria" as an integrative theory of schizophrenia: a dysfunction in cortical-subcortical-cerebellar circuitry? *Schizophr Bull* 24:203-218.
- Andrieux A, Salin P, Schweitzer A, Begou M, Pachoud B, Brun P, Gory-Faure S, Kujala P, Suaud-Chagny MF, Hofle G, Job D (2006) Microtubule stabilizer ameliorates synaptic function and behavior in a mouse model for schizophrenia. *Biol Psychiatry* 60:1224-1230.
- Andrieux A, Salin PA, Vernet M, Kujala P, Baratier J, Gory-Faure S, Bosc C, Pointu H, Proietto D, Schweitzer A, Denarier E, Klumperman J, Job D (2002) The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders. *Genes Dev* 16:2350-2364.
- Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41:881-890.
- Arai S, Takuma K, Mizoguchi H, Ibi D, Nagai T, Kamei H, Kim HC, Yamada K (2009) GABAB receptor agonist baclofen improves methamphetamine-induced cognitive deficit in mice. *Eur J Pharmacol* 602:101-104.
- Arseneault L, Cannon M, Witton J, Murray RM (2004) Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br J Psychiatry* 184:110-117.
- Ashtari M, Cottone J, Ardekani BA, Cervellione K, Szeszko PR, Wu J, Chen S, Kumra S (2007) Disruption of white matter integrity in the inferior longitudinal fasciculus in adolescents with schizophrenia as revealed by fiber tractography. *Arch Gen Psychiatry* 64:1270-1280.

- Audebert S, Koulakoff A, Berwald-Netter Y, Gros F, Denoulet P, Edde B (1994) Developmental regulation of polyglutamylated alpha- and beta-tubulin in mouse brain neurons. *J Cell Sci* 107 (Pt 8):2313-2322.
- Austin MP, Mitchell P, Goodwin GM (2001) Cognitive deficits in depression: possible implications for functional neuropathology. *Br J Psychiatry* 178:200-206.
- Baas PW, Joshi HC (1992) Gamma-tubulin distribution in the neuron: implications for the origins of neuritic microtubules. *J Cell Biol* 119:171-178.
- Baas PW, Slaughter T, Brown A, Black MM (1991) Microtubule dynamics in axons and dendrites. *J Neurosci Res* 30:134-153.
- Baas PW, Pienkowski TP, Cimbalnik KA, Toyama K, Bakalis S, Ahmad FJ, Kosik KS (1994) Tau confers drug stability but not cold stability to microtubules in living cells. *J Cell Sci* 107 (Pt 1):135-143.
- Badner JA, Gershon ES (2002) Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7:405-411.
- Bage GF, Samson R, Sinclair-Desgagne B (2004) A proactive approach can make site remediation less expensive. *Environ Manage* 34:449-460.
- Baker SA, Baker KA, Hagg T (2004) Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* 20:575-579.
- Bakshi VP, Geyer MA (1995) Antagonism of phencyclidine-induced deficits in prepulse inhibition by the putative atypical antipsychotic olanzapine. *Psychopharmacology (Berl)* 122:198-201.
- Ballard TM, Pauly-Evers M, Higgins GA, Ouagazzal AM, Mutel V, Borroni E, Kemp JA, Bluethmann H, Kew JN (2002) Severe impairment of NMDA receptor function in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site results in drug-resistant nonhabituating hyperactivity. *J Neurosci* 22:6713-6723.
- Ballon JS, Dean KA, Cadenhead KS (2008) Obstetrical complications in people at risk for developing schizophrenia. *Schizophr Res* 98:307-311.
- Balordi F, Fishell G (2007) Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci* 27:5936-5947.
- Bamburg JR, Bray D, Chapman K (1986) Assembly of microtubules at the tip of growing axons. *Nature* 321:788-790.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A (2004) Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* 29:450-460.
- Baratier J, Peris L, Brocard J, Gory-Faure S, Dufour F, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Blanchoin L, Salin P, Job D, Andrieux A (2006) Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *J Biol Chem* 281:19561-19569.
- Barker JL, Behar T, Li YX, Liu QY, Ma W, Maric D, Maric I, Schaffner AE, Serafini R, Smith SV, Somogyi R, Vautrin JY, Wen XL, Xian H (1998) GABAergic cells and signals in CNS development. *Perspect Dev Neurobiol* 5:305-322.
- Barra HS, Arce CA, Argarana CE (1988) Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. *Mol Neurobiol* 2:133-153.
- Bath KG, Mandairon N, Jing D, Rajagopal R, Kapoor R, Chen ZY, Khan T, Proenca CC, Kraemer R, Cleland TA, Hempstead BL, Chao MV, Lee FS (2008) Variant brain-derived neurotrophic factor (Val66Met) alters adult olfactory bulb neurogenesis and spontaneous olfactory discrimination. *J Neurosci* 28:2383-2393.
- Batista CM, Kippin TE, Willaime-Morawek S, Shimabukuro MK, Akamatsu W, van der Kooy D (2006) A progressive and cell non-autonomous increase in striatal neural stem cells in the Huntington's disease R6/2 mouse. *J Neurosci* 26:10452-10460.
- Begou M, Brun P, Bertrand JB, Job D, Schweitzer A, D'Amato T, Saoud M, Andrieux A, Suaud-Chagny MF (2007) Post-pubertal emergence of alterations in locomotor activity in stop null mice. *Synapse* 61:689-697.
- Begou M, Volle J, Bertrand JB, Brun P, Job D, Schweitzer A, Saoud M, D'Amato T, Andrieux A, Suaud-Chagny MF (2008) The stop null mice model for schizophrenia displays [corrected] cognitive and social deficits partly alleviated by neuroleptics. *Neuroscience* 157:29-39.
- Belluzzi O, Benedusi M, Ackman J, LoTurco JJ (2003) Electrophysiological differentiation of new neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 23:10411-10418.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.
- Benes FM, Vincent SL, Todtenkopf M (2001) The density of pyramidal and nonpyramidal neurons in anterior cingulate cortex of schizophrenic and bipolar subjects. *Biol Psychiatry* 50:395-406.
- Benes FM, Sorensen I, Vincent SL, Bird ED, Sathi M (1992) Increased density of glutamate-immunoreactive vertical processes in superficial laminae in cingulate cortex of schizophrenic brain. *Cereb Cortex* 2:503-512.

- Bentivoglio M, Mazzarello P (1999) The history of radial glia. *Brain Res Bull* 49:305-315.
- Bergami M, Berninger B, Canossa M (2009) Conditional deletion of TrkB alters adult hippocampal neurogenesis and anxiety-related behavior. *Commun Integr Biol* 2:14-16.
- Bergen LG, Borisy GG (1980) Head-to-tail polymerization of microtubules *in vitro*. Electron microscope analysis of seeded assembly. *J Cell Biol* 84:141-150.
- Berninger B, Costa MR, Koch U, Schroeder T, Sutor B, Grothe B, Gotz M (2007) Functional properties of neurons derived from *in vitro* reprogrammed postnatal astroglia. *J Neurosci* 27:8654-8664.
- Bernstein HG, Steiner J, Bogerts B (2009) Glial cells in schizophrenia: pathophysiological significance and possible consequences for therapy. *Expert Rev Neurother* 9:1059-1071.
- Bernstein HG, Krause S, Krell D, Dobrowolny H, Wolter M, Stauch R, Ranft K, Danos P, Jirikowski GF, Bogerts B (2007) Strongly reduced number of parvalbumin-immunoreactive projection neurons in the mammillary bodies in schizophrenia: further evidence for limbic neuropathology. *Ann N Y Acad Sci* 1096:120-127.
- Bertolino A, Esposito G, Callicott JH, Mattay VS, Van Horn JD, Frank JA, Berman KF, Weinberger DR (2000) Specific relationship between prefrontal neuronal N-acetylaspartate and activation of the working memory cortical network in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157:26-33.
- Biebl M, Cooper CM, Winkler J, Kuhn HG (2000) Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 291:17-20.
- Bielas SL, Gleeson JG (2004) Cytoskeletal-associated proteins in the migration of cortical neurons. *J Neurobiol* 58:149-159.
- Bielas SL, Serneo FF, Chechlacz M, Deerinck TJ, Perkins GA, Allen PB, Ellisman MH, Gleeson JG (2007) Spinophilin facilitates dephosphorylation of doublecortin by PP1 to mediate microtubule bundling at the axonal wrist. *Cell* 129:579-591.
- Bifulco M, Laezza C, Stingo S, Wolff J (2002) 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a membrane-bound, microtubule-associated protein and membrane anchor for tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1807-1812.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI (1985) The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 101:1371-1378.
- Black EJ, Catling AD, Woodgett JR, Kilbey A, Gillespie DA (1994) Transcriptional activation by the v-Jun oncoprotein is independent of positive regulatory phosphorylation. *Oncogene* 9:2363-2368.
- Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ (2001) Schizophrenia and affective disorders-- cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet* 69:428-433.
- Blackwood DH, Pickard BJ, Thomson PA, Evans KL, Porteous DJ, Muir WJ (2007) Are some genetic risk factors common to schizophrenia, bipolar disorder and depression? Evidence from DISC1, GRIK4 and NRG1. *Neurotox Res* 11:73-83.
- Bolteus AJ, Bordey A (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci* 24:7623-7631.
- Bondallaz P, Barbier A, Soehrman S, Grenningloh G, Riederer BM (2006) The control of microtubule stability *in vitro* and in transfected cells by MAP1B and SCG10. *Cell Motil Cytoskeleton* 63:681-695.
- Bonnet C, Boucher D, Lazereg S, Pedrotti B, Islam K, Denoulet P, Larcher JC (2001) Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *J Biol Chem* 276:12839-12848.
- Boog G (2004) Obstetrical complications and subsequent schizophrenia in adolescent and young adult offsprings: is there a relationship? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 114:130-136.
- Bordey A (2006) Adult neurogenesis: basic concepts of signaling. *Cell Cycle* 5:722-728.
- Borta A, Hoglinger GU (2007) Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem* 100:587-595.
- Bosc C, Cronk JD, Pirollet F, Watterson DM, Haiech J, Job D, Margolis RL (1996) Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2125-2130.
- Bosc C, Frank R, Denarier E, Ronjat M, Schweitzer A, Wehland J, Job D (2001) Identification of novel bifunctional calmodulin-binding and microtubule-stabilizing motifs in STOP proteins. *J Biol Chem* 276:30904-30913.
- Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, Black DL (2007) MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. *Genes Dev* 21:71-84.
- Bouvrais-Veret C, Weiss S, Andrieux A, Schweitzer A, McIntosh JM, Job D, Giros B, Martres MP (2007) Sustained increase of alpha7 nicotinic receptors and choline-induced improvement of learning deficit in STOP knock-out mice. *Neuropharmacology* 52:1691-1700.
- Boydell J, Van Os J, Lambri M, Castle D, Allardyce J, McCreadie RG, Murray RM (2003) Incidence of schizophrenia in south-east London between 1965 and 1997. *Br J Psychiatry* 182:45-49.
- Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, von der Behrens W, Kempermann

- G (2003) Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24:603-613.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157:115-118.
- Brenner E, Sonnewald U, Schweitzer A, Andrieux A, Nehlig A (2007) Hypoglutamatergic activity in the STOP knockout mouse: a potential model for chronic untreated schizophrenia. *J Neurosci Res* 85:3487-3493.
- Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Sestan N, Rakic P (2007) Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20558-20563.
- Breunig JJ, Sarkisian MR, Arellano JI, Morozov YM, Ayoub AE, Sojitra S, Wang B, Flavell RA, Rakic P, Town T (2008) Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13127-13132.
- Brezun JM, Daszuta A (1999) Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89:999-1002.
- Brigman JL, Padukiewicz KE, Sutherland ML, Rothblat LA (2006) Executive functions in the heterozygous reeler mouse model of schizophrenia. *Behav Neurosci* 120:984-988.
- Brill MS, Ninkovic J, Winpenny E, Hodge RD, Ozen I, Yang R, Lepier A, Gascon S, Erdelyi F, Szabo G, Parras C, Guillemot F, Frotscher M, Berninger B, Hevner RF, Raineteau O, Gotz M (2009) Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nat Neurosci* 12:1524-1533.
- Brown J, Cooper-Kuhn CM, Kempermann G, Van Praag H, Winkler J, Gage FH, Kuhn HG (2003) Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 17:2042-2046.
- Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S (2007) Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* 18:93-114.
- Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S (2006) Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 26:5888-5893.
- Brugg B, Matus A (1991) Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J Cell Biol* 114:735-743.
- Brugg B, Reddy D, Matus A (1993) Attenuation of microtubule-associated protein 1B expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits initiation of neurite outgrowth. *Neuroscience* 52:489-496.
- Brun P, Begou M, Andrieux A, Mouly-Badina L, Clerget M, Schweitzer A, Scarna H, Renaud B, Job D, Suaud-Chagny MF (2005) Dopaminergic transmission in STOP null mice. *J Neurochem* 94:63-73.
- Bulinski JC, Ohm T, Roder H, Spruston N, Turner DA, Wheal HV (1998) Changes in dendritic structure and function following hippocampal lesions: correlations with developmental events? *Prog Neurobiol* 55:641-650.
- Bunney WE, Bunney BG (2000) Evidence for a compromised dorsolateral prefrontal cortical parallel circuit in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31:138-146.
- Caceres A, Kosik KS (1990) Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343:461-463.
- Caceres A, Potrebic S, Kosik KS (1991) The effect of tau antisense oligonucleotides on neurite formation of cultured cerebellar macroneurons. *J Neurosci* 11:1515-1523.
- Caceres A, Mautino J, Kosik KS (1992) Suppression of MAP2 in cultured cerebellar macroneurons inhibits minor neurite formation. *Neuron* 9:607-618.
- Caceres A, Banker G, Steward O, Binder L, Payne M (1984a) MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res* 315:314-318.
- Caceres A, Binder LI, Payne MR, Bender P, Rebhun L, Steward O (1984b) Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J Neurosci* 4:394-410.
- Carden MJ, Schlaepfer WW, Lee VM (1985) The structure, biochemical properties, and immunogenicity of neurofilament peripheral regions are determined by phosphorylation state. *J Biol Chem* 260:9805-9817.
- Carleton A, Petreanu LT, Lansford R, Alvarez-Buylla A, Lledo PM (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nat Neurosci* 6:507-518.
- Carroll BJ, Martin FI, Davies B (1968) Resistance to suppression by dexamethasone of plasma 11-O.H.C.S. levels in severe depressive illness. *Br Med J* 3:285-287.
- Cassimeris L (2002) The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol* 14:18-24.
- Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, Gaiano N, Fishell G, Nye JS (2001) Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development* 128:689-702.
- Chauvet S, Cohen S, Yoshida Y, Fekrane L, Livet J, Gayet O, Segu L, Buhot MC, Jessell TM, Henderson CE, Mann F (2007) Gating of Sema3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to

- attraction during brain development. *Neuron* 56:807-822.
- Chen X, Sun C, Chen Q, O'Neill FA, Walsh D, Fanous AH, Chowdari KV, Nimgaonkar VL, Scott A, Schwab SG, Wildenauer DB, Che R, Tang W, Shi Y, He L, Luo XJ, Su B, Edwards TL, Zhao Z, Kendler KS (2009) Apoptotic engulfment pathway and schizophrenia. *PLoS One* 4:e6875.
- Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS (2006) Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* 314:140-143.
- Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci* 12:399-408.
- Cho JH, Johnson GV (2003) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem* 278:187-193.
- Choi BH, Lapham LW (1978) Radial glia in the human fetal cerebrum: a combined Golgi, immunofluorescent and electron microscopic study. *Brain Res* 148:295-311.
- Chun SK, Sun W, Park JJ, Jung MW (2006) Enhanced proliferation of progenitor cells following long-term potentiation induction in the rat dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem* 86:322-329.
- Church SM, Cotter D, Bramon E, Murray RM (2002) Does schizophrenia result from developmental or degenerative processes? *J Neural Transm Suppl*:129-147.
- Clapcote SJ, Lipina TV, Millar JK, Mackie S, Christie S, Ogawa F, Lerch JP, Trimble K, Uchiyama M, Sakuraba Y, Kaneda H, Shiroishi T, Houslay MD, Henkelman RM, Sled JG, Gondo Y, Porteous DJ, Roder JC (2007) Behavioral phenotypes of Disc1 missense mutations in mice. *Neuron* 54:387-402.
- Clark D, Dedova I, Cordwell S, Matsumoto I (2006) A proteome analysis of the anterior cingulate cortex gray matter in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 11:459-470, 423.
- Cooper-Kuhn CM, Vroemen M, Brown J, Ye H, Thompson MA, Winkler J, Kuhn HG (2002) Impaired adult neurogenesis in mice lacking the transcription factor E2F1. *Mol Cell Neurosci* 21:312-323.
- Couegnas A, Schweitzer A, Andrieux A, Ghandour MS, Boehm N (2007) Expression pattern of STOP lacZ reporter gene in adult and developing mouse brain. *J Neurosci Res* 85:1515-1527.
- Creese I, Burt DR, Snyder SH (1976) Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192:481-483.
- Cunningham MG, Bhattacharyya S, Benes FM (2002) Amygdalo-cortical sprouting continues into early adulthood: implications for the development of normal and abnormal function during adolescence. *J Comp Neurol* 453:116-130.
- Curtis MA, Penney EB, Pearson AG, van Roon-Mom WM, Butterworth NJ, Dragunow M, Connor B, Faull RL (2003) Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9023-9027.
- Czeh B, Lucassen PJ (2007) What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:250-260.
- Czeh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, van Kampen M, Bartolomucci A, Fuchs E (2001) Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12796-12801.
- Daniels M (1975) The role of microtubules in the growth and stabilization of nerve fibers. *Ann N Y Acad Sci* 253:535-544.
- Dawirs RR, Hildebrandt K, Teuchert-Noodt G (1998) Adult treatment with haloperidol increases dentate granule cell proliferation in the gerbil hippocampus. *J Neural Transm* 105:317-327.
- Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114:1179-1187.
- Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA (2005) New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol* 168:415-427.
- De Ferrari GV, Moon RT (2006) The ups and downs of Wnt signaling in prevalent neurological disorders. *Oncogene* 25:7545-7553.
- De Luca A, Pasini A, Amati F, Botta A, Spalletta G, Alimenti S, Caccamo F, Conti E, Trakalo J, Macciardi F, Dallapiccola B, Novelli G (2001) Association study of a promoter polymorphism of UFD1L gene with schizophrenia. *Am J Med Genet* 105:529-533.
- De Oliveira IR, Juruena MF (2006) Treatment of psychosis: 30 years of progress. *J Clin Pharm Ther* 31:523-534.
- Dehmelt L, Smart FM, Ozer RS, Halpain S (2003) The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J Neurosci* 23:9479-9490.
- Delay J, Deniker P, Harl JM (1952) [Therapeutic use in psychiatry of phenothiazine of central elective action (4560 RP)]. *Ann Med Psychol (Paris)* 110:112-117.
- Delotterie D, Ruiz G, Brocard J, Schweitzer A, Roucard C, Roche Y, Suaud-Chagny MF, Bressand K, Andrieux A (2010) Chronic administration of atypical antipsychotics improves behavioral and synaptic defects of STOP null mice. *Psychopharmacology (Berl)* 208:131-141.

- Deltheil T, Guiard BP, Cerdan J, David DJ, Tanaka KF, Reperant C, Guilloux JP, Coudore F, Hen R, Gardier AM (2008) Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. *Neuropharmacology* 55:1006-1014.
- Denarier E, Fourest-Lieuvain A, Bosc C, Pirollet F, Chapel A, Margolis RL, Job D (1998a) Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6055-6060.
- Denarier E, Aguezzoul M, Jolly C, Vourc'h C, Roure A, Andrieux A, Bosc C, Job D (1998b) Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse STOP gene (Mtap6). *Biochem Biophys Res Commun* 243:791-796.
- Dent EW, Gertler FB (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40:209-227.
- des Portes V, Boddaert N, Sacco S, Briault S, Maincent K, Bahi N, Gomot M, Ronce N, Bursztyjn J, Adamsbaum C, Zilbovicius M, Chelly J, Moraine C (2004) Specific clinical and brain MRI features in mentally retarded patients with mutations in the Oligophrenin-1 gene. *Am J Med Genet A* 124A:364-371.
- Desai A, Mitchison TJ (1997) Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:83-117.
- Desai A, Verma S, Mitchison TJ, Walczak CE (1999) Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell* 96:69-78.
- Desbonnet L, Waddington JL, Tuathaigh CM (2009) Mice mutant for genes associated with schizophrenia: common phenotype or distinct endophenotypes? *Behav Brain Res* 204:258-273.
- DiTella MC, Feiguin F, Carri N, Kosik KS, Caceres A (1996) MAP-1B/TAU functional redundancy during laminin-enhanced axonal growth. *J Cell Sci* 109 (Pt 2):467-477.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.
- Doll T, Meichsner M, Riederer BM, Honegger P, Matus A (1993) An isoform of microtubule-associated protein 2 (MAP2) containing four repeats of the tubulin-binding motif. *J Cell Sci* 106 (Pt 2):633-639.
- Dranovsky A, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis: regulation by stress and antidepressants. *Biol Psychiatry* 59:1136-1143.
- Drubin D, Kirschner M (1986a) Purification of tau protein from brain. *Methods Enzymol* 134:156-160.
- Drubin DG, Kirschner MW (1986b) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103:2739-2746.
- Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu XB, Yang CH, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng HJ, Ming GL, Lu B, Song H (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 130:1146-1158.
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59:1116-1127.
- Duman RS, Nakagawa S, Malberg J (2001) Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 25:836-844.
- Dupret D, Revest JM, Koehl M, Ichas F, De Giorgi F, Costet P, Abrous DN, Piazza PV (2008) Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3:e1959.
- Dwork AJ, Rosoklija G, Jones LB (2005) Reduced spinophilin in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 162:1389; author reply 1389-1390.
- Dyck BA, Skoblenick KJ, Castellano JM, Ki K, Thomas N, Mishra RK (2007) Synapsin II knockout mice show sensorimotor gating and behavioural abnormalities similar to those in the phencyclidine-induced preclinical animal model of schizophrenia. *Schizophr Res* 97:292-293.
- Eastwood SL, Lyon L, George L, Andrieux A, Job D, Harrison PJ (2007) Altered expression of synaptic protein mRNAs in STOP (MAP6) mutant mice. *J Psychopharmacol* 21:635-644.
- Eaton WW, Hall AL, Macdonald R, McKibben J (2007) Case identification in psychiatric epidemiology: a review. *Int Rev Psychiatry* 19:497-507.
- Eckenhoff MF, Rakic P (1984) Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J Comp Neurol* 223:1-21.
- Edde B, Rossier J, Le Caer JP, Desbruyeres E, Gros F, Denoulet P (1990) Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* 247:83-85.
- Edelman AM, Mitchelhill KI, Selbert MA, Anderson KA, Hook SS, Stapleton D, Goldstein EG, Means AR, Kemp BE (1996) Multiple Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase kinases from rat brain. Purification, regulation by Ca(2+)-calmodulin, and partial amino acid sequence. *J Biol Chem* 271:10806-10810.
- Edwards AM, Ross NW, Ulmer JB, Braun PE (1989) Interaction of myelin basic protein and proteolipid protein. *J Neurosci Res* 22:97-102.
- Eells JB, Misler JA, Nikodem VM (2006) Early postnatal isolation reduces dopamine levels, elevates dopamine

- turnover and specifically disrupts prepulse inhibition in *Nurr1*-null heterozygous mice. *Neuroscience* 140:1117-1126.
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257-269.
- Eipper BA (1972) Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2283-2287.
- Eisenberg DP, Berman KF (2010) Executive function, neural circuitry, and genetic mechanisms in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 35:258-277.
- El Yazaji M, Battas O, Agoub M, Moussaoui D, Gutknecht C, Dalery J, d'Amato T, Saoud M (2002) Validity of the depressive dimension extracted from principal component analysis of the PANSS in drug-free patients with schizophrenia. *Schizophr Res* 56:121-127.
- Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PT, Cools AR (1998) The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* 30:251-260.
- Elvevag B, Goldberg TE (2000) Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit Rev Neurobiol* 14:1-21.
- Encinas JM, Enikolopov G (2008) Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol* 85:243-272.
- Encinas JM, Vahtokari A, Enikolopov G (2006) Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8233-8238.
- Erbel-Sieler C, Dudley C, Zhou Y, Wu X, Estill SJ, Han T, Diaz-Arrastia R, Brunskill EW, Potter SS, McKnight SL (2004) Behavioral and regulatory abnormalities in mice deficient in the NPAS1 and NPAS3 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13648-13653.
- Erck C, Peris L, Andrieux A, Meissirel C, Gruber AD, Vernet M, Schweitzer A, Saoudi Y, Pointu H, Bosc C, Salin PA, Job D, Wehland J (2005) A vital role of tubulin-tyrosine-ligase for neuronal organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7853-7858.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF (2005) Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25:10074-10086.
- Eyer J, Peterson A (1994) Neurofilament-deficient axons and perikaryal aggregates in viable transgenic mice expressing a neurofilament-beta-galactosidase fusion protein. *Neuron* 12:389-405.
- Fallon JH (1988) Topographic organization of ascending dopaminergic projections. *Ann N Y Acad Sci* 537:1-9.
- Feng R, Rampon C, Tang YP, Shrom D, Jin J, Kyin M, Sopher B, Miller MW, Ware CB, Martin GM, Kim SH, Langdon RB, Sisodia SS, Tsien JZ (2001) Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron* 32:911-926.
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23:373-382.
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20:847-854.
- Fitzsimmons J, Kubicki M, Smith K, Bushell G, Estepar RS, Westin CF, Nestor PG, Niznikiewicz MA, Kikinis R, McCarley RW, Shenton ME (2009) Diffusion tractography of the fornix in schizophrenia. *Schizophr Res* 107:39-46.
- Fone KC, Porkess MV (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1087-1102.
- Fornito A, Yucel M, Patti J, Wood SJ, Pantelis C (2009) Mapping grey matter reductions in schizophrenia: an anatomical likelihood estimation analysis of voxel-based morphometry studies. *Schizophr Res* 108:104-113.
- Fossati P, Ergis AM, Allilaire JF (2001) Problem-solving abilities in unipolar depressed patients: comparison of performance on the modified version of the Wisconsin and the California sorting tests. *Psychiatry Res* 104:145-156.
- Fourest-Lieuvin A, Peris L, Gache V, Garcia-Saez I, Juillan-Binard C, Lantéz V, Job D (2006) Microtubule regulation in mitosis: tubulin phosphorylation by the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Mol Biol Cell* 17:1041-1050.
- Fradley RL, O'Meara GF, Newman RJ, Andrieux A, Job D, Reynolds DS (2005) STOP knockout and NMDA NR1 hypomorphic mice exhibit deficits in sensorimotor gating. *Behav Brain Res* 163:257-264.
- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J (1999) Doublecortin is a developmentally

- regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* 23:247-256.
- Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J, Francis F (2003) Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex* 13:620-626.
- Fritzen S, Lauer M, Schmitt A, Topner T, Strobel A, Lesch KP, Reif A (2007) NO synthase-positive striatal interneurons are decreased in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 17:595-599.
- Fuchs E, Weber K (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 63:345-382.
- Gage FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Galiano MR, Bosc C, Schweitzer A, Andrieux A, Job D, Hallak ME (2004) Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms. *J Neurosci Res* 78:329-337.
- Gallagher BJ, 3rd, Jones BJ, McFalls JA, Jr., Pisa AM (2007) Schizophrenic subtype, seasonality of birth and social class: a preliminary analysis. *Eur Psychiatry* 22:123-128.
- Gao Z, Ure K, Ables JL, Lagace DC, Nave KA, Goebbels S, Eisch AJ, Hsieh J (2009) Neurod1 is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 12:1090-1092.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241.
- Garcia ML, Lobsiger CS, Shah SB, Deerinck TJ, Crum J, Young D, Ward CM, Crawford TO, Gotow T, Uchiyama Y, Ellisman MH, Calcutt NA, Cleveland DW (2003) NF-M is an essential target for the myelin-directed "outside-in" signaling cascade that mediates radial axonal growth. *J Cell Biol* 163:1011-1020.
- Gard DL, Kirschner MW (1985) A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J Cell Biol* 100:764-774.
- Gascon E, Dayer AG, Sauvain MO, Potter G, Jenny B, De Roo M, Zraggen E, Demareux N, Muller D, Kiss JZ (2006) GABA regulates dendritic growth by stabilizing lamellipodia in newly generated interneurons of the olfactory bulb. *J Neurosci* 26:12956-12966.
- Ge S, Pradhan DA, Ming GL, Song H (2007) GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci* 30:1-8.
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H (2006) GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439:589-593.
- Geyer MA, Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW (1993) Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 34:361-372.
- Giachino C, De Marchis S, Giampietro C, Parlato R, Perroteau I, Schutz G, Fasolo A, Peretto P (2005) cAMP response element-binding protein regulates differentiation and survival of newborn neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 25:10105-10118.
- Giedd JN, Vaituzis AC, Hamburger SD, Lange N, Rajapakse JC, Kaysen D, Vauss YC, Rapoport JL (1996) Quantitative MRI of the temporal lobe, amygdala, and hippocampus in normal human development: ages 4-18 years. *J Comp Neurol* 366:223-230.
- Glantz LA, Lewis DA (2000) Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57:65-73.
- Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA, Jarskog LF (2006) Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophr Res* 81:47-63.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23:257-271.
- Gogtay N, Sporn A, Clasen LS, Nugent TF, 3rd, Greenstein D, Nicolson R, Giedd JN, Lenane M, Gochman P, Evans A, Rapoport JL (2004) Comparison of progressive cortical gray matter loss in childhood-onset schizophrenia with that in childhood-onset atypical psychoses. *Arch Gen Psychiatry* 61:17-22.
- Gold PW, Chrousos GP (2002) Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry* 7:254-275.
- Goldman SA, Zukhar A, Barami K, Mikawa T, Niedzwiecki D (1996) Ependymal/subependymal zone cells of postnatal and adult songbird brain generate both neurons and nonneuronal siblings *in vitro* and *in vivo*. *J Neurobiol* 30:505-520.
- Goldstein JM, Goodman JM, Seidman LJ, Kennedy DN, Makris N, Lee H, Tourville J, Caviness VS, Jr., Faraone SV, Tsuang MT (1999) Cortical abnormalities in schizophrenia identified by structural magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry* 56:537-547.
- Gong C, Wang TW, Huang HS, Parent JM (2007) Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J Neurosci* 27:1803-1811.
- Gonzalez-Martinez JA, Bingaman WE, Toms SA, Najm IM (2007) Neurogenesis in the postnatal human epileptic brain. *J Neurosurg* 107:628-635.
- Goold RG, Owen R, Gordon-Weeks PR (1999) Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-

- associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *J Cell Sci* 112 (Pt 19):3373-3384.
- Gordon-Weeks PR (1991a) Microtubule organization in growth cones. *Biochem Soc Trans* 19:1080-1085.
- Gordon-Weeks PR (1991b) Control of microtubule assembly in growth cones. *J Cell Sci Suppl* 15:45-49.
- Gory-Faure S, Windscheid V, Bosc C, Peris L, Proietto D, Franck R, Denarier E, Job D, Andrieux A (2006) STOP-like protein 21 is a novel member of the STOP family, revealing a Golgi localization of STOP proteins. *J Biol Chem* 281:28387-28396.
- Gotz M, Huttner WB (2005) The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:777-788.
- Gotz M, Barde YA (2005) Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron* 46:369-372.
- Gotz M, Stoykova A, Gruss P (1998) Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21:1031-1044.
- Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG (2001) Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10910-10917.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2:260-265.
- Gourion D, Goldberger C, Bourdel MC, Bayle FJ, Millet B, Olie JP, Krebs MO (2003) Neurological soft-signs and minor physical anomalies in schizophrenia: differential transmission within families. *Schizophr Res* 63:181-187.
- Grace AA (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41:1-24.
- Gravel M, Peterson J, Yong VW, Kottis V, Trapp B, Braun PE (1996) Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Mol Cell Neurosci* 7:453-466.
- Green B, Kavanagh DJ, Young RM (2007) Predictors of cannabis use in men with and without psychosis. *Addict Behav* 32:2879-2887.
- Greenberg SM, Koo EH, Selkoe DJ, Qiu WQ, Kosik KS (1994) Secreted beta-amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7104-7108.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986a) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:4913-4917.
- Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986b) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084-6089.
- Guillaud L, Bosc C, Fourest-Lieuvin A, Denarier E, Pirollet F, Lafanechere L, Job D (1998) STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells. *J Cell Biol* 142:167-179.
- Guillin O, Abi-Dargham A, Laruelle M (2007) Neurobiology of dopamine in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 78:1-39.
- Guo X, Hamilton PJ, Reish NJ, Sweatt JD, Miller CA, Rumbaugh G (2009) Reduced expression of the NMDA receptor-interacting protein SynGAP causes behavioral abnormalities that model symptoms of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34:1659-1672.
- Hagan JJ, Jones DN (2005) Predicting drug efficacy for cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophr Bull* 31:830-853.
- Halim ND, Weickert CS, McClintock BW, Weinberger DR, Lipska BK (2004) Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 29:1063-1069.
- Halpain S, Dehmelt L (2006) The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7:224.
- Hammond JW, Cai D, Verhey KJ (2008) Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 20:71-76.
- Han YG, Spassky N, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo JM, Aguilar A, Schneider-Maunoury S, Alvarez-Buylla A (2008) Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 11:277-284.
- Hanaya R, Koning E, Ferrandon A, Schweitzer A, Andrieux A, Nehlig A (2008) Deletion of the STOP gene, a microtubule stabilizing factor, leads only to discrete cerebral metabolic changes in mice. *J Neurosci Res* 86:813-820.
- Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T, Hirokawa N (1994) Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369:488-491.
- Harrison PJ (2004) The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its

- pathophysiological implications. *Psychopharmacology (Berl)* 174:151-162.
- Harrison PJ (2007) Schizophrenia susceptibility genes and their neurodevelopmental implications: focus on neuregulin 1. *Novartis Found Symp* 288:246-255; discussion 255-249, 276-281.
- Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* 229:15-30.
- Hashimoto T, Matsubara T, Lewis DA (2010) [Schizophrenia and cortical GABA neurotransmission]. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* 112:439-452.
- Hatten ME (1999) Central nervous system neuronal migration. *Annu Rev Neurosci* 22:511-539.
- Hatten ME (2002) New directions in neuronal migration. *Science* 297:1660-1663.
- Haukvik UK, Lawyer G, Bjerkan PS, Hartberg CB, Jonsson EG, McNeil T, Agartz I (2009) Cerebral cortical thickness and a history of obstetric complications in schizophrenia. *J Psychiatr Res* 43:1287-1293.
- Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P (2000) Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 20:5764-5774.
- Heald R, Nogales E (2002) Microtubule dynamics. *J Cell Sci* 115:3-4.
- Heckers S (2001) Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia. *Hippocampus* 11:520-528.
- Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, Feldon J, Moran MC, Nelson P (2000) Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience* 100:749-768.
- Heine VM, Maslam S, Joels M, Lucassen PJ (2004) Increased P27KIP1 protein expression in the dentate gyrus of chronically stressed rats indicates G1 arrest involvement. *Neuroscience* 129:593-601.
- Heins N, Malatesta P, Ceconi F, Nakafuku M, Tucker KL, Hack MA, Chapouton P, Barde YA, Gotz M (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* 5:308-315.
- Herrmann H, Aebi U (2000) Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 12:79-90.
- Hikida T, Jaaro-Peled H, Seshadri S, Oishi K, Hookway C, Kong S, Wu D, Xue R, Andrade M, Tankou S, Mori S, Gallagher M, Ishizuka K, Pletnikov M, Kida S, Sawa A (2007) Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14501-14506.
- Hirokawa N (1994) Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6:74-81.
- Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726-735.
- Hoglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, Alvarez-Fischer D, Boutillier AL, Degregori J, Oertel WH, Rakic P, Hirsch EC, Hunot S (2007) The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3585-3590.
- Holmberg J, Armulik A, Senti KA, Edoff K, Spalding K, Momma S, Cassidy R, Flanagan JG, Frisen J (2005) Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev* 19:462-471.
- Holtom PE, Needham PL, Bennett GW, Aspley S (2000) Chronic, but not acute, dosing of antipsychotic drugs alters neurotensin binding in rat brain regions. *Br J Pharmacol* 131:990-996.
- Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE (2005) Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry* 162:2233-2245.
- Hornstein E, Shomron N (2006) Canalization of development by microRNAs. *Nat Genet* 38 Suppl:S20-24.
- Hornung JP (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* 26:331-343.
- Huang GJ, Herbert J (2006) Stimulation of neurogenesis in the hippocampus of the adult rat by fluoxetine requires rhythmic change in corticosterone. *Biol Psychiatry* 59:619-624.
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417:455-458.
- Hurtado-Chong A, Yusta-Boyo MJ, Vergano-Vera E, Bulfone A, de Pablo F, Vicario-Abejon C (2009) IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *Eur J Neurosci* 30:742-755.
- Huttenlocher PR, Dabholkar AS (1997) Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 387:167-178.
- Ibrahim HM, Hogg AJ, Jr., Healy DJ, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH (2000) Ionotropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157:1811-1823.
- Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa E (1998) A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15718-15723.
- Jablensky A (2000) Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *Eur Arch*

- Psychiatry Clin Neurosci 250:274-285.
- Jacquet H, Raux G, Thibaut F, Hecketsweiler B, Houy E, Demilly C, Haouzir S, Allio G, Fouldrin G, Drouin V, Bou J, Petit M, Campion D, Frebourg T (2002) PRODH mutations and hyperprolinemia in a subset of schizophrenic patients. *Hum Mol Genet* 11:2243-2249.
- Jagasia R, Steib K, Englberger E, Herold S, Faus-Kessler T, Saxe M, Gage FH, Song H, Lie DC (2009) GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 29:7966-7977.
- Janosi IM, Chretien D, Flyvbjerg H (2002) Structural microtubule cap: stability, catastrophe, rescue, and third state. *Biophys J* 83:1317-1330.
- Jentsch JD, Roth RH (1999) The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20:201-225.
- Jessberger S, Toni N, Clemenson GD, Jr., Ray J, Gage FH (2008) Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat Neurosci* 11:888-893.
- Jha S, Rajendran R, Davda J, Vaidya VA (2006) Selective serotonin depletion does not regulate hippocampal neurogenesis in the adult rat brain: differential effects of p-chlorophenylalanine and 5,7-dihydroxytryptamine. *Brain Res* 1075:48-59.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11946-11950.
- Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA (2004a) Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13363-13367.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA (2004b) Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:343-347.
- Jin K, Sun Y, Xie L, Bateau S, Mao XO, Smelick C, Logvinova A, Greenberg DA (2003) Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* 2:175-183.
- Job D, Margolis RL (1984) Isolation from bovine brain of a superstable microtubule subpopulation with microtubule seeding activity. *Biochemistry* 23:3025-3031.
- Job D, Fischer EH, Margolis RL (1981) Rapid disassembly of cold-stable microtubules by calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:4679-4682.
- Job D, Rauch CT, Fischer EH, Margolis RL (1982) Recycling of cold-stable microtubules: evidence that cold stability is due to substoichiometric polymer blocks. *Biochemistry* 21:509-515.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34.
- Johnstone EC, Crow TJ, Frith CD, Husband J, Kreel L (1976) Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet* 2:924-926.
- Jones PB, Rantakallio P, Hartikainen AL, Isohanni M, Sipila P (1998) Schizophrenia as a long-term outcome of pregnancy, delivery, and perinatal complications: a 28-year follow-up of the 1966 north Finland general population birth cohort. *Am J Psychiatry* 155:355-364.
- Joo JY, Kim BW, Lee JS, Park JY, Kim S, Yun YJ, Lee SH, Lee SH, Rhim H, Son H (2007) Activation of NMDA receptors increases proliferation and differentiation of hippocampal neural progenitor cells. *J Cell Sci* 120:1358-1370.
- Kaech S, Parmar H, Roelandse M, Bornmann C, Matus A (2001) Cytoskeletal microdifferentiation: a mechanism for organizing morphological plasticity in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7086-7092.
- Kalman M (1998) Astroglial architecture of the carp (*Cyprinus carpio*) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP). *Anat Embryol (Berl)* 198:409-433.
- Kamiya A, Kubo K, Tomoda T, Takaki M, Youn R, Ozeki Y, Sawamura N, Park U, Kudo C, Okawa M, Ross CA, Hatten ME, Nakajima K, Sawa A (2005) A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol* 7:1167-1178.
- Kamnasaran D, Muir WJ, Ferguson-Smith MA, Cox DW (2003) Disruption of the neuronal PAS3 gene in a family affected with schizophrenia. *J Med Genet* 40:325-332.
- Kaplan MS (1981) Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. *J Comp Neurol* 195:323-338.
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092-1094.
- Kappeler C, Saillour Y, Baudoin JP, Tuy FP, Alvarez C, Houbon C, Gaspar P, Hamard G, Chelly J, Metin C, Francis F (2006) Branching and nucleokinesis defects in migrating interneurons derived from doublecortin knockout mice. *Hum Mol Genet* 15:1387-1400.
- Kappeler C, Dhenain M, Phan Dinh Tuy F, Saillour Y, Marty S, Fallet-Bianco C, Souville I, Souil E, Pinard JM, Meyer G, Encha-Razavi F, Volk A, Beldjord C, Chelly J, Francis F (2007) Magnetic resonance imaging and histological studies of corpus callosal and hippocampal abnormalities linked to doublecortin

- deficiency. *J Comp Neurol* 500:239-254.
- Karcher RL, Deacon SW, Gelfand VI (2002) Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. *Trends Cell Biol* 12:21-27.
- Karim SA, Barrie JA, McCulloch MC, Montague P, Edgar JM, Iden DL, Anderson TJ, Nave KA, Griffiths IR, McLaughlin M (2010) PLP/DM20 Expression and turnover in a transgenic mouse model of pelizaeus-merzbacher disease. *Glia*.
- Karlsson RM, Tanaka K, Heilig M, Holmes A (2008) Loss of glial glutamate and aspartate transporter (excitatory amino acid transporter 1) causes locomotor hyperactivity and exaggerated responses to psychotomimetics: rescue by haloperidol and metabotropic glutamate 2/3 agonist. *Biol Psychiatry* 64:810-814.
- Karlsson RM, Tanaka K, Saksida LM, Bussey TJ, Heilig M, Holmes A (2009) Assessment of glutamate transporter GLAST (EAAT1)-deficient mice for phenotypes relevant to the negative and executive/cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34:1578-1589.
- Kempermann G, Wiskott L, Gage FH (2004a) Functional significance of adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 14:186-191.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G (2004b) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447-452.
- Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391-399.
- Kerjan G, Gleeson JG (2007) Genetic mechanisms underlying abnormal neuronal migration in classical lissencephaly. *Trends Genet* 23:623-630.
- Khawaja S, Gundersen GG, Bulinski JC (1988) Enhanced stability of microtubules enriched in deetyrosinated tubulin is not a direct function of deetyrosination level. *J Cell Biol* 106:141-149.
- Kim EJ, Leung CT, Reed RR, Johnson JE (2007) *In vivo* analysis of Ascl1 defined progenitors reveals distinct developmental dynamics during adult neurogenesis and gliogenesis. *J Neurosci* 27:12764-12774.
- Kishi K (1987) Golgi studies on the development of granule cells of the rat olfactory bulb with reference to migration in the subependymal layer. *J Comp Neurol* 258:112-124.
- Kishi T, Tsumori T, Ono K, Yokota S, Ishino H, Yasui Y (2000) Topographical organization of projections from the subiculum to the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 419:205-222.
- Klejbor I, Myers JM, Hausknecht K, Corso TD, Gambino AS, Morys J, Maher PA, Hard R, Richards J, Stachowiak EK, Stachowiak MK (2006) Fibroblast growth factor receptor signaling affects development and function of dopamine neurons - inhibition results in a schizophrenia-like syndrome in transgenic mice. *J Neurochem* 97:1243-1258.
- Kobayashi K (2009) Targeting the hippocampal mossy fiber synapse for the treatment of psychiatric disorders. *Mol Neurobiol* 39:24-36.
- Kodama M, Fujioka T, Duman RS (2004) Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biol Psychiatry* 56:570-580.
- Koike H, Arguello PA, Kvajo M, Karayiorgou M, Gogos JA (2006) *Disc1* is mutated in the 129S6/SvEv strain and modulates working memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3693-3697.
- Koizumi H, Tanaka T, Gleeson JG (2006a) Doublecortin-like kinase functions with doublecortin to mediate fiber tract decussation and neuronal migration. *Neuron* 49:55-66.
- Koizumi H, Higginbotham H, Poon T, Tanaka T, Brinkman BC, Gleeson JG (2006b) Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 9:779-786.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679-683.
- Konick LC, Friedman L (2001) Meta-analysis of thalamic size in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49:28-38.
- Kosaka K, Kosaka T (2005a) synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anat Sci Int* 80:80-90.
- Kosaka K, Toida K, Aika Y, Kosaka T (1998) How simple is the organization of the olfactory glomerulus?: the heterogeneity of so-called periglomerular cells. *Neurosci Res* 30:101-110.
- Kosaka T, Kosaka K (2005b) Structural organization of the glomerulus in the main olfactory bulb. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i107-108.
- Kosaka T, Hataguchi Y, Hama K, Nagatsu I, Wu JY (1985) Coexistence of immunoreactivities for glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase in some neurons in the periglomerular region of the rat main olfactory bulb: possible coexistence of gamma-aminobutyric acid (GABA) and dopamine. *Brain Res* 343:166-171.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL (1989) Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2:1389-1397.
- Kreczmanski P, Heinsen H, Mantua V, Woltersdorf F, Masson T, Ulfig N, Schmidt-Kastner R, Korr H, Steinbusch HW, Hof PR, Schmitz C (2007) Volume, neuron density and total neuron number in five

- subcortical regions in schizophrenia. *Brain* 130:678-692.
- Kriegebaum C, Gutknecht L, Schmitt A, Lesch KP, Reif A (2010) [Serotonin now: Part 1. Neurobiology and developmental genetics]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 78:319-331.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32:149-184.
- Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G (2003) Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 467:455-463.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51:199-214.
- Kubicki M, Westin CF, McCarley RW, Shenton ME (2005a) The application of DTI to investigate white matter abnormalities in schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1064:134-148.
- Kubicki M, Park H, Westin CF, Nestor PG, Mulkern RV, Maier SE, Niznikiewicz M, Connor EE, Levitt JJ, Frumin M, Kikinis R, Jolesz FA, McCarley RW, Shenton ME (2005b) DTI and MTR abnormalities in schizophrenia: analysis of white matter integrity. *Neuroimage* 26:1109-1118.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Kuroki N, Kubicki M, Nestor PG, Salisbury DF, Park HJ, Levitt JJ, Woolston S, Frumin M, Niznikiewicz M, Westin CF, Maier SE, McCarley RW, Shenton ME (2006) Fornix integrity and hippocampal volume in male schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 60:22-31.
- Kursula P (2008) Structural properties of proteins specific to the myelin sheath. *Amino Acids* 34:175-185.
- Labrie V, Lipina T, Roder JC (2008) Mice with reduced NMDA receptor glycine affinity model some of the negative and cognitive symptoms of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 200:217-230.
- Lachman HM, Pedrosa E, Petruolo OA, Cockerham M, Papolos A, Novak T, Papolos DF, Stopkova P (2007) Increase in GSK3beta gene copy number variation in bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B:259-265.
- Lagace DC, Benavides DR, Kansy JW, Mapelli M, Greengard P, Bibb JA, Eisch AJ (2008) Cdk5 is essential for adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18567-18571.
- Laruelle M (2000) The role of endogenous sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: implications from recent brain imaging studies. *Brain Res Brain Res Rev* 31:371-384.
- Lasek RJ (1986) Polymer sliding in axons. *J Cell Sci Suppl* 5:161-179.
- Lee MK, Cleveland DW (1996) Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* 19:187-217.
- Lee PR, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JI (2007) Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. *Brain Res* 1156:152-167.
- Lee VM, Carden MJ, Schlaepfer WW, Trojanowski JQ (1987) Monoclonal antibodies distinguish several differentially phosphorylated states of the two largest rat neurofilament subunits (NF-H and NF-M) and demonstrate their existence in the normal nervous system of adult rats. *J Neurosci* 7:3474-3488.
- Leuner B, Shors TJ (2004) New spines, new memories. *Mol Neurobiol* 29:117-130.
- Lewis SE, Nixon RA (1988) Multiple phosphorylated variants of the high molecular mass subunit of neurofilaments in axons of retinal cell neurons: characterization and evidence for their differential association with stationary and moving neurofilaments. *J Cell Biol* 107:2689-2701.
- Li C, Watanabe G, Weng Q, Jin W, Furuta C, Suzuki AK, Kawaguchi M, Taya K (2005) Expression of nerve growth factor (NGF), and its receptors TrkA and p75 in the reproductive organs of the adult male rats. *Zoolog Sci* 22:933-937.
- Li G, Kataoka H, Coughlin SR, Pleasure SJ (2009) Identification of a transient subpial neurogenic zone in the developing dentate gyrus and its regulation by Cxcl12 and reelin signaling. *Development* 136:327-335.
- Li W, Zhou Y, Jentsch JD, Brown RA, Tian X, Ehninger D, Hennah W, Peltonen L, Lonnqvist J, Huttunen MO, Kaprio J, Trachtenberg JT, Silva AJ, Cannon TD (2007) Specific developmental disruption of disrupted-in-schizophrenia-1 function results in schizophrenia-related phenotypes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18280-18285.
- Lieberman JA, Sheitman BB, Kinon BJ (1997) Neurochemical sensitization in the pathophysiology of schizophrenia: deficits and dysfunction in neuronal regulation and plasticity. *Neuropsychopharmacology* 17:205-229.
- Lillien L, Raphael H (2000) BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. *Development* 127:4993-5005.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28:713-726.
- Lim DA, Suarez-Farinas M, Naef F, Hacker CR, Menn B, Takebayashi H, Magnasco M, Patil N, Alvarez-Buylla

- A (2006) *In vivo* transcriptional profile analysis reveals RNA splicing and chromatin remodeling as prominent processes for adult neurogenesis. *Mol Cell Neurosci* 31:131-148.
- Lipska BK, Weinberger DR (1993) Delayed effects of neonatal hippocampal damage on haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced stereotypic behaviors in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 75:213-222.
- Lipska BK, Jaskiw GE, Weinberger DR (1993) Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 9:67-75.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271:978-981.
- LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR (1995) GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 15:1287-1298.
- Luzzati F, De Marchis S, Fasolo A, Peretto P (2006) Neurogenesis in the caudate nucleus of the adult rabbit. *J Neurosci* 26:609-621.
- Mackie S, Millar JK, Porteous DJ (2007) Role of DISC1 in neural development and schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 17:95-102.
- MacRae TH (1997) Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action. *Eur J Biochem* 244:265-278.
- Madsen TM, Kristjansen PE, Bolwig TG, Wortwein G (2003) Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience* 119:635-642.
- Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingstrom A (2000) Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry* 47:1043-1049.
- Maeda K, Sugino H, Hirose T, Kitagawa H, Nagai T, Mizoguchi H, Takuma K, Yamada K (2007) Clozapine prevents a decrease in neurogenesis in mice repeatedly treated with phencyclidine. *J Pharmacol Sci* 103:299-308.
- Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T (2007) The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27:435-448.
- Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* 127:5253-5263.
- Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Gotz M (2003) Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* 37:751-764.
- Malberg JE, Duman RS (2003) Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 28:1562-1571.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20:9104-9110.
- Manev H, Uz T, Smalheiser NR, Manev R (2001) Antidepressants alter cell proliferation in the adult brain *in vivo* and in neural cultures *in vitro*. *Eur J Pharmacol* 411:67-70.
- Manganas LN, Zhang X, Li Y, Hazel RD, Smith SD, Wagshul ME, Henn F, Benveniste H, Djuric PM, Enikolopov G, Maletic-Savatic M (2007) Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science* 318:980-985.
- Mao Y, Ge X, Frank CL, Madison JM, Koehler AN, Doud MK, Tassa C, Berry EM, Soda T, Singh KK, Biechele T, Petryshen TL, Moon RT, Haggarty SJ, Tsai LH (2009) Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. *Cell* 136:1017-1031.
- Marengo S, Weinberger DR (2000) The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: following a trail of evidence from cradle to grave. *Dev Psychopathol* 12:501-527.
- Margolis RL, Job D (1984) Control of microtubule stability by calmodulin-dependent and -independent phosphorylation. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 17:417-425.
- Margolis RL, Wilson L, Keifer BI (1978) Mitotic mechanism based on intrinsic microtubule behaviour. *Nature* 272:450-452.
- Margolis RL, Rauch CT, Job D (1986) Purification and assay of a 145-kDa protein (STOP145) with microtubule-stabilizing and motility behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:639-643.
- Margolis RL, Rauch CT, Pirollet F, Job D (1990) Specific association of STOP protein with microtubules *in vitro* and with stable microtubules in mitotic spindles of cultured cells. *Embo J* 9:4095-4102.
- Markakis EA, Gage FH (1999) Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *J Comp Neurol* 406:449-460.
- Marty A, Llano I (2005) Excitatory effects of GABA in established brain networks. *Trends Neurosci* 28:284-289.

- Marx A, Muller J, Mandelkow E (2005) The structure of microtubule motor proteins. *Adv Protein Chem* 71:299-344.
- Matus A (1990a) Microtubule-associated proteins and the determination of neuronal form. *J Physiol (Paris)* 84:134-137.
- Matus A (1990b) Microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2:10-14.
- McDonald HY, Wojtowicz JM (2005) Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats. *Neurosci Lett* 385:70-75.
- McGrath J, El-Saadi O, Grim V, Cardy S, Chapple B, Chant D, Lieberman D, Mowry B (2002) Minor physical anomalies and quantitative measures of the head and face in patients with psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 59:458-464.
- Melanson-Drapeau L, Beyko S, Dave S, Hebb AL, Franks DJ, Sellitto C, Paul DL, Bennett SA (2003) Oligodendrocyte progenitor enrichment in the connexin32 null-mutant mouse. *J Neurosci* 23:1759-1768.
- Meltzer HY (1991) The mechanism of action of novel antipsychotic drugs. *Schizophr Bull* 17:263-287.
- Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2004) Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17528-17532.
- Meshi D, Drew MR, Saxe M, Ansorge MS, David D, Santarelli L, Malapani C, Moore H, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci* 9:729-731.
- Millar JK, Thomson PA, Wray NR, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ (2003) Response to Amar J. Klar: The chromosome 1;11 translocation provides the best evidence supporting genetic etiology for schizophrenia and bipolar affective disorders. *Genetics* 163:833-835; author reply 837-838.
- Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, Devon RS, St Clair DM, Muir WJ, Blackwood DH, Porteous DJ (2000) Disruption of two novel genes by a translocation cosegregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9:1415-1423.
- Miller FD, Gauthier-Fisher A (2009) Home at last: neural stem cell niches defined. *Cell Stem Cell* 4:507-510.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2008) Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.
- Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312:237-242.
- Mitelman SA, Byne W, Kemether EM, Hazlett EA, Buchsbaum MS (2005) Metabolic disconnection between the mediodorsal nucleus of the thalamus and cortical Brodmann's areas of the left hemisphere in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 162:1733-1735.
- Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Mori H, Mishina M, Nabeshima T (2001) Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor epsilon1 subunit. *J Neurosci* 21:750-757.
- Moore CA, Perderiset M, Francis F, Chelly J, Houdusse A, Milligan RA (2004) Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin. *Mol Cell* 14:833-839.
- Moore CA, Perderiset M, Kappeler C, Kain S, Drummond D, Perkins SJ, Chelly J, Cross R, Houdusse A, Francis F (2006) Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton. *Embo J* 25:4448-4457.
- Morest DK (1970) A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young. *Z Anat Entwicklungsgesch* 130:265-305.
- Morris JA, Kandpal G, Ma L, Austin CP (2003) DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia 1) is a centrosome-associated protein that interacts with MAP1A, MIPT3, ATF4/5 and NUDEL: regulation and loss of interaction with mutation. *Hum Mol Genet* 12:1591-1608.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, Weiss S, van der Kooy D (1994) Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13:1071-1082.
- Mortensen PB, Pedersen CB, Westergaard T, Wohlfahrt J, Ewald H, Mors O, Andersen PK, Melbye M (1999) Effects of family history and place and season of birth on the risk of schizophrenia. *N Engl J Med* 340:603-608.
- Muller MJ, Szegedi A, Wetzel H, Benkert O (2001) Depressive factors and their relationships with other symptom domains in schizophrenia, schizoaffective disorder, and psychotic depression. *Schizophr Bull* 27:19-28.
- Murase S, Horwitz AF (2002) Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 22:3568-3579.
- Naber PA, Witter MP (1998) Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double-labeling,

- retrograde-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 393:284-297.
- Nacher J, Varea E, Miguel Blasco-Ibanez J, Gomez-Climent MA, Castillo-Gomez E, Crespo C, Martinez-Guijarro FJ, McEwen BS (2007) N-methyl-d-aspartate receptor expression during adult neurogenesis in the rat dentate gyrus. *Neuroscience* 144:855-864.
- Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, Zhang YJ, Nestler EJ, Duman RS (2002) Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci* 22:3673-3682.
- Neckameyer WS (2010) A trophic role for serotonin in the development of a simple feeding circuit. *Dev Neurosci* 32:217-237.
- Nestor PG, Kubicki M, Kuroki N, Gurrera RJ, Niznikiewicz M, Shenton ME, McCarley RW (2007) Episodic memory and neuroimaging of hippocampus and fornix in chronic schizophrenia. *Psychiatry Res* 155:21-28.
- Neve RL, Selkoe DJ, Kurnit DM, Kosik KS (1986) A cDNA for a human microtubule associated protein 2 epitope in the Alzheimer neurofibrillary tangle. *Brain Res* 387:193-196.
- Newcomer JW, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Selke G, Melson AK, Hershey T, Craft S, Olney JW (1999) Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology* 20:106-118.
- Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY (2005) Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308:1923-1927.
- Nguyen L, Malgrange B, Breuskin I, Bettendorff L, Moonen G, Belachew S, Rigo JM (2003) Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J Neurosci* 23:3278-3294.
- Ninkovic J, Mori T, Gotz M (2007) Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis. *J Neurosci* 27:10906-10911.
- Nissant A, Bardy C, Katagiri H, Murray K, Lledo PM (2009) Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 12:728-730.
- Nixon RA (1993) The regulation of neurofilament protein dynamics by phosphorylation: clues to neurofibrillary pathobiology. *Brain Pathol* 3:29-38.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Kriegstein AR (2008) Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol* 508:28-44.
- Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7:136-144.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature* 409:714-720.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR (2002) Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* 22:3161-3173.
- Nogales E (1999) A structural view of microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci* 56:133-142.
- Noiges R, Eichinger R, Kutschera W, Fischer I, Nemeth Z, Wiche G, Propst F (2002) Microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B: light chains determine distinct functional properties. *J Neurosci* 22:2106-2114.
- Nopoulos P, Torres I, Flaum M, Andreasen NC, Ehrhardt JC, Yuh WT (1995) Brain morphology in first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 152:1721-1723.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11:437-444.
- Nyiri G, Freund TF, Somogyi P (2001) Input-dependent synaptic targeting of alpha(2)-subunit-containing GABA(A) receptors in synapses of hippocampal pyramidal cells of the rat. *Eur J Neurosci* 13:428-442.
- O'Keefe GC, Tyers P, Aarsland D, Dalley JW, Barker RA, Caldwell MA (2009) Dopamine-induced proliferation of adult neural precursor cells in the mammalian subventricular zone is mediated through EGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:8754-8759.
- Ohara O, Gahara Y, Miyake T, Teraoka H, Kitamura T (1993) Neurofilament deficiency in quail caused by nonsense mutation in neurofilament-L gene. *J Cell Biol* 121:387-395.
- Oleskevich S, Descarries L, Watkins KC, Seguela P, Daszuta A (1991) Ultrastructural features of the serotonin innervation in adult rat hippocampus: an immunocytochemical description in single and serial thin sections. *Neuroscience* 42:777-791.
- Orban-Nemeth Z, Simader H, Badurek S, Trancikova A, Propst F (2005) Microtubule-associated protein 1S, a short and ubiquitously expressed member of the microtubule-associated protein 1 family. *J Biol Chem* 280:2257-2265.
- Overstreet-Wadiche LS, Westbrook GL (2006) Functional maturation of adult-generated granule cells.

- Hippocampus 16:208-215.
- Overstreet-Wadiche LS, Bensen AL, Westbrook GL (2006) Delayed development of adult-generated granule cells in dentate gyrus. *J Neurosci* 26:2326-2334.
- Overstreet Wadiche L, Bromberg DA, Bensen AL, Westbrook GL (2005) GABAergic signaling to newborn neurons in dentate gyrus. *J Neurophysiol* 94:4528-4532.
- Pak CW, Flynn KC, Bamberg JR (2008) Actin-binding proteins take the reins in growth cones. *Nat Rev Neurosci* 9:136-147.
- Parent JM, Lowenstein DH (2002) Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res* 135:121-131.
- Parent JM, Tada E, Fike JR, Lowenstein DH (1999) Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. *J Neurosci* 19:4508-4519.
- Parent JM, Elliott RC, Pleasure SJ, Barbaro NM, Lowenstein DH (2006) Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 59:81-91.
- Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17:3727-3738.
- Patel TD, Zhou FC (2005) Ontogeny of 5-HT1A receptor expression in the developing hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 157:42-57.
- Paturle-Lafanechere L, Manier M, Trigault N, Pirollet F, Mazarguil H, Job D (1994) Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* 107 (Pt 6):1529-1543.
- Paturle-Lafanechere L, Edde B, Denoulet P, Van Dorsselaer A, Mazarguil H, Le Caer JP, Wehland J, Job D (1991) Characterization of a major brain tubulin variant which cannot be tyrosinated. *Biochemistry* 30:10523-10528.
- Paus T, Castro-Alamancos MA, Petrides M (2001) Cortico-cortical connectivity of the human mid-dorsolateral frontal cortex and its modulation by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Eur J Neurosci* 14:1405-1411.
- Peris L, Thery M, Faure J, Saudi Y, Lafanechere L, Chilton JK, Gordon-Weeks P, Galjart N, Bornens M, Wordeman L, Wehland J, Andrieux A, Job D (2006) Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *J Cell Biol* 174:839-849.
- Petzold A, Eikelenboom MJ, Keir G, Grant D, Lazeron RH, Polman CH, Uitdehaag BM, Thompson EJ, Giovannoni G (2005) Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76:206-211.
- Phillips W, Morton AJ, Barker RA (2005) Abnormalities of neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease are attributable to the *in vivo* microenvironment. *J Neurosci* 25:11564-11576.
- Picard H, Amado I, Mouchet-Mages S, Olie JP, Krebs MO (2008) The role of the cerebellum in schizophrenia: an update of clinical, cognitive, and functional evidences. *Schizophr Bull* 34:155-172.
- Pieper AA, Wu X, Han TW, Estill SJ, Dang Q, Wu LC, Reece-Fincannon S, Dudley CA, Richardson JA, Brat DJ, McKnight SL (2005) The neuronal PAS domain protein 3 transcription factor controls FGF-mediated adult hippocampal neurogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14052-14057.
- Pirollet F, Job D, Fischer EH, Margolis RL (1983) Purification and characterization of sheep brain cold-stable microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1560-1564.
- Pirollet F, Rauch CT, Job D, Margolis RL (1989) Monoclonal antibody to microtubule-associated STOP protein: affinity purification of neuronal STOP activity and comparison of antigen with activity in neuronal and nonneuronal cell extracts. *Biochemistry* 28:835-842.
- Pirollet F, Derancourt J, Haiech J, Job D, Margolis RL (1992) Ca(2+)-calmodulin regulated effectors of microtubule stability in bovine brain. *Biochemistry* 31:8849-8855.
- Platel JC, Lacar B, Bordey A (2007) GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J Mol Histol* 38:303-311.
- Platel JC, Dave KA, Bordey A (2008a) Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. *J Physiol* 586:3739-3743.
- Platel JC, Heintz T, Young S, Gordon V, Bordey A (2008b) Tonic activation of GLUK5 kainate receptors decreases neuroblast migration in whole-mounts of the subventricular zone. *J Physiol* 586:3783-3793.
- Platel JC, Dave KA, Gordon V, Lacar B, Rubio ME, Bordey A (2010) NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron* 65:859-872.
- Pletnikov MV, Ayhan Y, Nikolskaia O, Xu Y, Ovanesov MV, Huang H, Mori S, Moran TH, Ross CA (2008) Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 13:173-186, 115.

- Poirier S, Legris G, Tremblay P, Michea R, Viau-Guay L, Merette C, Bouchard RH, Maziade M, Roy MA (2010) Schizophrenia patients with polydipsia and water intoxication are characterized by greater severity of psychotic illness and a more frequent history of alcohol abuse. *Schizophr Res* 118:285-291.
- Porteous DJ, Thomson P, Brandon NJ, Millar JK (2006) The genetics and biology of DISC1--an emerging role in psychosis and cognition. *Biol Psychiatry* 60:123-131.
- Powell KJ, Hori SE, Leslie R, Andrieux A, Schellinck H, Thorne M, Robertson GS (2007) Cognitive impairments in the STOP null mouse model of schizophrenia. *Behav Neurosci* 121:826-835.
- Radley JJ, Jacobs BL (2002) 5-HT1A receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res* 955:264-267.
- Rakic P (2003) Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* 43:19-32.
- Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legeravereud C, Deloulme JC (2007) S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia* 55:165-177.
- Rastogi A, Zai C, Likhodi O, Kennedy JL, Wong AH (2009) Genetic association and post-mortem brain mRNA analysis of DISC1 and related genes in schizophrenia. *Schizophr Res* 114:39-49.
- Raux G, Bonnet-Brilhault F, Louchart S, Houy E, Gantier R, Levillain D, Allio G, Haouzir S, Petit M, Martinez M, Frebourg T, Thibaut F, Campion D (2002) The -2 bp deletion in exon 6 of the 'alpha 7-like' nicotinic receptor subunit gene is a risk factor for the P50 sensory gating deficit. *Mol Psychiatry* 7:1006-1011.
- Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ (2006) Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16:2166-2172.
- Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch KP (2006) Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry* 11:514-522.
- Rice D, Barone S, Jr. (2000) Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3:511-533.
- Richard M, Sacquet J, Jany M, Schweitzer A, Jourdan F, Andrieux A, Pellier-Monnin V (2009) STOP proteins contribute to the maturation of the olfactory system. *Mol Cell Neurosci* 41:120-134.
- Roberts RC (2007) Schizophrenia in translation: disrupted in schizophrenia (DISC1): integrating clinical and basic findings. *Schizophr Bull* 33:11-15.
- Rochlin MW, Dailey ME, Bridgman PC (1999) Polymerizing microtubules activate site-directed F-actin assembly in nerve growth cones. *Mol Biol Cell* 10:2309-2327.
- Roger B, Al-Bassam J, Dehmelt L, Milligan RA, Halpain S (2004) MAP2c, but not tau, binds and bundles F-actin via its microtubule binding domain. *Curr Biol* 14:363-371.
- Roybon L, Deierborg T, Brundin P, Li JY (2009) Involvement of Ngn2, Tbr and NeuroD proteins during postnatal olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 29:232-243.
- Roybon L, Mastracci TL, Ribeiro D, Sussel L, Brundin P, Li JY GABAergic differentiation induced by Mash1 is compromised by the bHLH proteins Neurogenin2, NeuroD1, and NeuroD2. *Cereb Cortex* 20:1234-1244.
- Rusch N, Spoletini I, Wilke M, Bria P, Di Paola M, Di Iulio F, Martinotti G, Caltagirone C, Spalletta G (2007) Prefrontal-thalamic-cerebellar gray matter networks and executive functioning in schizophrenia. *Schizophr Res* 93:79-89.
- Sahay A, Hen R (2007) Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat Neurosci* 10:1110-1115.
- Sahay A, Drew MR, Hen R (2007) Dentate gyrus neurogenesis and depression. *Prog Brain Res* 163:697-722.
- Sairanen M, Lucas G, Ernfors P, Castren M, Castren E (2005) Brain-derived neurotrophic factor and antidepressant drugs have different but coordinated effects on neuronal turnover, proliferation, and survival in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 25:1089-1094.
- Sakamoto Y, Tanaka N, Ichimiya T, Kurihara T, Nakamura KT (2005) Crystal structure of the catalytic fragment of human brain 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase. *J Mol Biol* 346:789-800.
- Sallet PC, Elkis H, Alves TM, Oliveira JR, Sassi E, Campi de Castro C, Busatto GF, Gattaz WF (2003) Reduced cortical folding in schizophrenia: an MRI morphometric study. *Am J Psychiatry* 160:1606-1613.
- Sancho-Tello M, Valles S, Montoliu C, Renau-Piqueras J, Guerri C (1995) Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. *Glia* 15:157-166.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805-809.
- Saoud M, d'Amato T, Gutknecht C, Triboulet P, Bertaud JP, Marie-Cardine M, Dalery J, Rochet T (2000) Neuropsychological deficit in siblings discordant for schizophrenia. *Schizophr Bull* 26:893-902.
- Saugstad LF (1999) A lack of cerebral lateralization in schizophrenia is within the normal variation in brain maturation but indicates late, slow maturation. *Schizophr Res* 39:183-196.
- Sawamura N, Sawa A (2006) Disrupted-in-schizophrenia-1 (DISC1): a key susceptibility factor for major mental illnesses. *Ann NY Acad Sci* 1086:126-133.

- Saxe MD, Malleret G, Vronskaya S, Mendez I, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Hen R (2007) Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4642-4646.
- Saxe MD, Battaglia F, Wang JW, Malleret G, David DJ, Monckton JE, Garcia AD, Sofroniew MV, Kandel ER, Santarelli L, Hen R, Drew MR (2006) Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17501-17506.
- Schaar BT, Kinoshita K, McConnell SK (2004) Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron* 41:203-213.
- Schaefer AW, Kabir N, Forscher P (2002) Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J Cell Biol* 158:139-152.
- Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL (2000) Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci* 20:6144-6158.
- Schlett K (2006) Glutamate as a modulator of embryonic and adult neurogenesis. *Curr Top Med Chem* 6:949-960.
- Schlosser RG, Nenadic I, Wagner G, Gullmar D, von Consbruch K, Kohler S, Schultz CC, Koch K, Fitzek C, Matthews PM, Reichenbach JR, Sauer H (2007) White matter abnormalities and brain activation in schizophrenia: a combined DTI and fMRI study. *Schizophr Res* 89:1-11.
- Schmechel DE, Rakic P (1979) A Golgi study of radial glial cells in developing monkey telencephalon: morphogenesis and transformation into astrocytes. *Anat Embryol (Berl)* 156:115-152.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.
- Schnitzer J, Franke WW, Schachner M (1981) Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol* 90:435-447.
- Schoenfeld TA, McKerracher L, Obar R, Vallee RB (1989) MAP 1A and MAP 1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J Neurosci* 9:1712-1730.
- Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4:7-25.
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439:283-289.
- Schwab SG, Wildenauer DB (2009) Update on key previously proposed candidate genes for schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry* 22:147-153.
- Selemon LD, Goldman-Rakic PS (1999) The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45:17-25.
- Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS (1995) Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch Gen Psychiatry* 52:805-818; discussion 819-820.
- Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS (1998) Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: application of a three-dimensional, stereologic counting method. *J Comp Neurol* 392:402-412.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359-378.
- Sernagor E, Chabrol F, Bony G, Cancedda L GABAergic control of neurite outgrowth and remodeling during development and adult neurogenesis: general rules and differences in diverse systems. *Front Cell Neurosci* 4:11.
- Sharma N, Kress Y, Shafit-Zagardo B (1994) Antisense MAP-2 oligonucleotides induce changes in microtubule assembly and neuritic elongation in pre-existing neurites of rat cortical neurons. *Cell Motil Cytoskeleton* 27:234-247.
- Sheline YI (2003) Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol Psychiatry* 54:338-352.
- Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH (1999) Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci* 19:5034-5043.
- Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S (2008) Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* 3:289-300.
- Shergill SS, Kanaan RA, Chitnis XA, O'Daly O, Jones DK, Frangou S, Williams SC, Howard RJ, Barker GJ, Murray RM, McGuire P (2007) A diffusion tensor imaging study of fasciculi in schizophrenia. *Am J*

- Psychiatry 164:467-473.
- Shetty AK, Rao MS, Hattiangady B, Zaman V, Shetty GA (2004) Hippocampal neurotrophin levels after injury: Relationship to the age of the hippocampus at the time of injury. *J Neurosci Res* 78:520-532.
- Shi WX (2007) The auditory cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 61:829-830.
- Shimazu K, Zhao M, Sakata K, Akbarian S, Bates B, Jaenisch R, Lu B (2006) NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. *Learn Mem* 13:307-315.
- Shimizu H, Iwayama Y, Yamada K, Toyota T, Minabe Y, Nakamura K, Nakajima M, Hattori E, Mori N, Osumi N, Yoshikawa T (2006) Genetic and expression analyses of the STOP (MAP6) gene in schizophrenia. *Schizophr Res* 84:244-252.
- Shors TJ, Townsend DA, Zhao M, Kozorovitskiy Y, Gould E (2002) Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* 12:578-584.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372-376.
- Silverstein ML, Mavroleftheros G, Turnbull A (2003) Premorbid factors in relation to motor, memory, and executive functions deficits in adult schizophrenia. *Schizophr Res* 61:271-280.
- Sisti HM, Glass AL, Shors TJ (2007) Neurogenesis and the spacing effect: learning over time enhances memory and the survival of new neurons. *Learn Mem* 14:368-375.
- Slaughter T, Black MM (2003) STOP (stable-tubule-only-polypeptide) is preferentially associated with the stable domain of axonal microtubules. *J Neurocytol* 32:399-413.
- Smith CL, Afroz R, Bassell GJ, Furneaux HM, Perrone-Bizzozero NI, Burry RW (2004) GAP-43 mRNA in growth cones is associated with HuD and ribosomes. *J Neurobiol* 61:222-235.
- Smith RE, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH (2001a) Vesicular glutamate transporter transcript expression in the thalamus in schizophrenia. *Neuroreport* 12:2885-2887.
- Smith RE, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH (2001b) Expression of excitatory amino acid transporter transcripts in the thalamus of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 158:1393-1399.
- Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, Wojtowicz JM (2005) A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience* 130:843-852.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2005) Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 25:10-18.
- Spencer KM, Nestor PG, Perlmutter R, Niznikiewicz MA, Klump MC, Frumin M, Shenton ME, McCarley RW (2004) Neural synchrony indexes disordered perception and cognition in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17288-17293.
- Stanfield BB, Trice JE (1988) Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res* 72:399-406.
- Stevenson JA, Yoon MG (1981) Mitosis of radial glial cells in the optic tectum of adult goldfish. *J Neurosci* 1:862-875.
- Stichel CC, Lips K, Wunderlich G, Muller HW (1996) Reconstruction of transected postcommissural fornix in adult rat by Schwann cell suspension grafts. *Exp Neurol* 140:21-36.
- Stoothoff WH, Johnson GV (2005) Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences. *Biochim Biophys Acta* 1739:280-297.
- Strong MJ (2004) Amyotrophic lateral sclerosis: contemporary concepts in etiopathogenesis and pharmacotherapy. *Expert Opin Investig Drugs* 13:1593-1614.
- Sweet RA, Fish KN, Lewis DA Mapping Synaptic Pathology within Cerebral Cortical Circuits in Subjects with Schizophrenia. *Front Hum Neurosci* 4:44.
- Szebenyi G, Bollati F, Bisbal M, Sheridan S, Faas L, Wray R, Haferkamp S, Nguyen S, Caceres A, Brady ST (2005) Activity-driven dendritic remodeling requires microtubule-associated protein 1A. *Curr Biol* 15:1820-1826.
- Takei K, Yamasue H, Abe O, Yamada H, Inoue H, Suga M, Sekita K, Sasaki H, Rogers M, Aoki S, Kasai K (2008) Disrupted integrity of the fornix is associated with impaired memory organization in schizophrenia. *Schizophr Res* 103:52-61.
- Takei Y, Teng J, Harada A, Hirokawa N (2000) Defects in axonal elongation and neuronal migration in mice with disrupted tau and map1b genes. *J Cell Biol* 150:989-1000.
- Tanaka E, Sabry J (1995) Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell* 83:171-176.
- Tanaka EM, Kirschner MW (1991) Microtubule behavior in the growth cones of living neurons during axon elongation. *J Cell Biol* 115:345-363.
- Tanaka T, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Gleeson JG (2004a) Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol* 165:709-721.

- Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, Kulkarni AB, Tsai LH, Gleeson JG (2004b) Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* 41:215-227.
- Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA (2008) Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res* 102:1-18.
- Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS (2009) Schizophrenia, "just the facts" 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr Res* 110:1-23.
- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH (2006) NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442:929-933.
- Taylor KR, Holzer AK, Bazan JF, Walsh CA, Gleeson JG (2000) Patient mutations in doublecortin define a repeated tubulin-binding domain. *J Biol Chem* 275:34442-34450.
- Teng J, Takei Y, Harada A, Nakata T, Chen J, Hirokawa N (2001) Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J Cell Biol* 155:65-76.
- Thompson A, Boekhoorn K, Van Dam AM, Lucassen PJ (2008) Changes in adult neurogenesis in neurodegenerative diseases: cause or consequence? *Genes Brain Behav* 7 Suppl 1:28-42.
- Thompson PM, Vidal C, Giedd JN, Gochman P, Blumenthal J, Nicolson R, Toga AW, Rapoport JL (2001) Mapping adolescent brain change reveals dynamic wave of accelerated gray matter loss in very early-onset schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11650-11655.
- Tian G, Lewis SA, Feierbach B, Stearns T, Rommelaere H, Ampe C, Cowan NJ (1997) Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *J Cell Biol* 138:821-832.
- Tochigi M, Okazaki Y, Kato N, Sasaki T (2004) What causes seasonality of birth in schizophrenia? *Neurosci Res* 48:1-11.
- Togel M, Wiche G, Propst F (1998) Novel features of the light chain of microtubule-associated protein MAP1B: microtubule stabilization, self interaction, actin filament binding, and regulation by the heavy chain. *J Cell Biol* 143:695-707.
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (2008) Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11:901-907.
- Toro CT, Deakin JF (2007) Adult neurogenesis and schizophrenia: a window on abnormal early brain development? *Schizophr Res* 90:1-14.
- Torrey EF, Barci BM, Webster MJ, Bartko JJ, Meador-Woodruff JH, Knable MB (2005) Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biol Psychiatry* 57:252-260.
- Trinczek B, Biernat J, Baumann K, Mandelkow EM, Mandelkow E (1995) Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell* 6:1887-1902.
- Tsuang M (2000) Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry* 47:210-220.
- Tsuchida A, Fellows LK (2009) Lesion evidence that two distinct regions within prefrontal cortex are critical for n-back performance in humans. *J Cogn Neurosci* 21:2263-2275.
- Tucker RP, Binder LI, Matus AI (1988) Differential localization of the high- and low-molecular weight variants of MAP2 in the developing retina. *Brain Res* 466:313-318.
- Tucker RP, Garner CC, Matus A (1989) In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron* 2:1245-1256.
- Ueki T, Tanaka M, Yamashita K, Mikawa S, Qiu Z, Maragakis NJ, Hevner RF, Miura N, Sugimura H, Sato K (2003) A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 23:11732-11740.
- Van Erp TG, Saleh PA, Rosso IM, Huttunen M, Lonnqvist J, Pirkola T, Salonen O, Valanne L, Poutanen VP, Standertskjold-Nordenstam CG, Cannon TD (2002) Contributions of genetic risk and fetal hypoxia to hippocampal volume in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder, their unaffected siblings, and healthy unrelated volunteers. *Am J Psychiatry* 159:1514-1520.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266-270.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.
- van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10:272-282.
- Venkatasubramanian G (2007) Schizophrenia is a disorder of aberrant neurodevelopment: A synthesis of evidence from clinical and structural, functional and neurochemical brain imaging studies. *Indian J Psychiatry* 49:244-249.
- Verhey KJ, Gaertig J (2007) The tubulin code. *Cell Cycle* 6:2152-2160.
- Verret L, Jankowsky JL, Xu GM, Borchelt DR, Rampon C (2007) Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic

- mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 27:6771-6780.
- Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK (2007) The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 21:744-749.
- Wagner JP, Black IB, DiCicco-Bloom E (1999) Stimulation of neonatal and adult brain neurogenesis by subcutaneous injection of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 19:6006-6016.
- Wakade CG, Mahadik SP, Waller JL, Chiu FC (2002) Atypical neuroleptics stimulate neurogenesis in adult rat brain. *J Neurosci Res* 69:72-79.
- Walker EF, Diforio D, Baum K (1999) Developmental neuropathology and the precursors of schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 395:12-19.
- Wang DD, Kriegstein AR (2008) GABA regulates excitatory synapse formation in the neocortex via NMDA receptor activation. *J Neurosci* 28:5547-5558.
- Wang HD, Dunnavant FD, Jarman T, Deutch AY (2004) Effects of antipsychotic drugs on neurogenesis in the forebrain of the adult rat. *Neuropsychopharmacology* 29:1230-1238.
- Wang JW, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, Hen R (2008) Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *J Neurosci* 28:1374-1384.
- Warner-Schmidt JL, Duman RS (2007) VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:4647-4652.
- Warner-Schmidt JL, Madsen TM, Duman RS (2008) Electroconvulsive seizure restores neurogenesis and hippocampus-dependent fear memory after disruption by irradiation. *Eur J Neurosci* 27:1485-1493.
- Weickert CS, Rothmond DA, Hyde TM, Kleinman JE, Straub RE (2008) Reduced DTNBP1 (dysbindin-1) mRNA in the hippocampal formation of schizophrenia patients. *Schizophr Res* 98:105-110.
- Weidenhofer J, Bowden NA, Scott RJ, Tooney PA (2006) Altered gene expression in the amygdala in schizophrenia: up-regulation of genes located in the cytomatrix active zone. *Mol Cell Neurosci* 31:243-250.
- Weinberger DR, Lipska BK (1995) Cortical maldevelopment, anti-psychotic drugs, and schizophrenia: a search for common ground. *Schizophr Res* 16:87-110.
- Weinberger DR, Berman KF, Suddath R, Torrey EF (1992) Evidence of dysfunction of a prefrontal-limbic network in schizophrenia: a magnetic resonance imaging and regional cerebral blood flow study of discordant monozygotic twins. *Am J Psychiatry* 149:890-897.
- Weisenberg RC (1972) Microtubule formation *in vitro* in solutions containing low calcium concentrations. *Science* 177:1104-1105.
- Welte MA (2004) Bidirectional transport along microtubules. *Curr Biol* 14:R525-537.
- Wen PH, Shao X, Shao Z, Hof PR, Wisniewski T, Kelley K, Friedrich VL, Jr., Ho L, Pasinetti GM, Shioi J, Robakis NK, Elder GA (2002) Overexpression of wild type but not an FAD mutant presenilin-1 promotes neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neurobiol Dis* 10:8-19.
- Westermann S, Weber K (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:938-947.
- Winner B, Geyer M, Couillard-Despres S, Aigner R, Bogdahn U, Aigner L, Kuhn G, Winkler J (2006) Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp Neurol* 197:113-121.
- Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S (2006) Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 16:296-304.
- Wolff J, Zambito AM, Britto PJ, Knipling L (2000) Autopalmitoylation of tubulin. *Protein Sci* 9:1357-1364.
- Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET (2000) Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157:16-25.
- Wright NF, Erichsen JT, Vann SD, O'Mara SM, Aggleton JP (2010) Parallel but separate inputs from limbic cortices to the mammillary bodies and anterior thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 518:2334-2354.
- Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y (1999) Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature* 400:331-336.
- Xiao S, McLean J, Robertson J (2006) Neuronal intermediate filaments and ALS: a new look at an old question. *Biochim Biophys Acta* 1762:1001-1012.
- Yasuno F, Suhara T, Okubo Y, Ichimiya T, Takano A, Sudo Y, Inoue M (2005) Abnormal effective connectivity of dopamine D2 receptor binding in schizophrenia. *Psychiatry Res* 138:197-207.
- Yu W, Ling C, Baas PW (2001) Microtubule reconfiguration during axogenesis. *J Neurocytol* 30:861-875.
- Zetzsche T, Preuss UW, Frodl T, Leinsinger G, Born C, Reiser M, Hegerl U, Moller HJ, Meisenzahl EM (2008) White matter alterations in schizophrenic patients with pronounced negative symptomatology and with positive family history for schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 258:278-284.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH (2006) Distinct morphological stages of dentate

- granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26:3-11.
- Zhao M, Li D, Shimazu K, Zhou YX, Lu B, Deng CX (2007a) Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis. *Biol Psychiatry* 62:381-390.
- Zhao S, Chai X, Frotscher M (2007b) Balance between neurogenesis and gliogenesis in the adult hippocampus: role for reelin. *Dev Neurosci* 29:84-90.
- Zhou SY, Suzuki M, Takahashi T, Hagino H, Kawasaki Y, Matsui M, Seto H, Kurachi M (2007) Parietal lobe volume deficits in schizophrenia spectrum disorders. *Schizophr Res* 89:35-48.
- Zhou Y, Shu N, Liu Y, Song M, Hao Y, Liu H, Yu C, Liu Z, Jiang T (2008) Altered resting-state functional connectivity and anatomical connectivity of hippocampus in schizophrenia. *Schizophr Res* 100:120-132.
- Zhu Q, Couillard-Despres S, Julien JP (1997) Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp Neurol* 148:299-316.

7 ANNEXES

7.1 Table des figures

<u>FIGURE 1</u> : RELATIONS ENTRE LES DIMENSIONS CLINIQUES ET LES DIAGNOSTICS CATEGORIELS AU SEIN DU CONTINUUM PSYCHOTIQUE	22
<u>FIGURE 2</u> : COMPARAISON DES DELAIS DE DEROULEMENT DES DIFFERENTS PROCESSUS NEURODEVELOPPEMENTAUX HUMAINS (RICE AND BARONE, 2000).....	23
<u>FIGURE 3</u> : SCHEMA RECAPITULATIF DES MECANISMES ETIOPATHOGENIQUES IMPLIQUES DANS L'ORIGINE NEURODEVELOPPEMENTALE ET DANS L'EVOLUTION TEMPORELLE DE LA SCHIZOPHRENIE	27
<u>FIGURE 4</u> : TABLEAU RECAPITULATIF DES ALTERATIONS DES FONCTIONS EXECUTIVES ASSOCIEES AUX DEFAUTS ANATOMIQUES CEREBRAUX DANS LA SCHIZOPHRENIE HUMAINE (D'APRES EISENBERG ET BERMAN).	29
<u>FIGURE 5</u> : DIFFERENTS RESEAUX D'ACTINE PRESENTS DANS LES CONES DE CROISSANCE NEURONAUX (PAK ET AL., 2008).	40
<u>FIGURE 6</u> : REPRESENTATIONS SCHEMATIQUES DE PROTOFILAMENTS ET DE MICROTUBULES.....	42
<u>FIGURE 7</u> : DISTRIBUTION DU CYTOSQUELETTE MICROTUBULAIRE DANS LE CONE DE CROISSANCE (EXTRAIT DE DENT ET GERTLER, 2003).	46
<u>FIGURE 8</u> : PRESENTATION DES DIFFERENTS ANTIGENES DE STOP CONTENUS DANS DES CULTURES D'OLIGODENDROCYTES ET D'ASTROCYTES (D'APRES GALIANO ET AL, 2004).....	54
<u>FIGURE 9</u> : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ISOFORMES NEURONALES N- ET E-STOP DE SOURIS.....	55
<u>FIGURE 10</u> : STABILISATION DES MICROTUBULES DES CELLULES HeLa APRES TRANSFECTION DE L'ADNC DE NSTOP.	57
<u>FIGURE 11</u> : LOCALISATION DE LA PROTEINE STOP PHOSPHORYLEE DANS DES NEURONES D'HIPPOCAMPE DIFFERENCIES (D'APRES BARATIER ET AL, 2006).	58
<u>FIGURE 12</u> : CONSTRUCTION GENOMIQUE DE L'INVALIDATION DU GENE STOP DANS LA SOURIS (D'APRES ANDRIEUX ET AL, 2002).....	60
<u>FIGURE 13</u> : TABLEAU RECAPITULATIF DES TROUBLES COMPORTEMENTAUX ET ANATOMIQUES DES MODELES MURINS RELATANT CERTAINS ASPECTS DE PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA SCHIZOPHRENIE (DES BONNET ET AL, 2009).....	65
<u>FIGURE 14</u> : TABLEAU RECAPITULATIF DES TROUBLES COMPORTEMENTAUX ET ANATOMIQUES DES MODELES MURINS MUTANTS DONT LES GENES SONT ASSOCIES AUX RISQUES DE SCHIZOPHRENIE (DES BONNET ET AL, 2009).....	67
<u>FIGURE 15</u> : HISTORIQUE DE LA DESCRIPTION DES CELLULES GLIALES RADIAIRES ET DE LEUR RELATION AVEC LES NEURONES D'APRES BENTIVOGLIO ET MAZARELLO, 1999.....	71
<u>FIGURE 16</u> : RECAPITULATIF DES DIFFERENTS MARQUEURS DE CELLULES GLIALES RADIAIRES.	73
<u>FIGURE 17</u> : SCHEMA REPRESENTANT LE ROLE DES CELLULES GLIALES RADIAIRES PENDANT LA NEUROGENESE EMBRYONNAIRE DU CORTEX DE SOURIS. D'APRES (NOCTOR ET AL., 2002).	74
<u>FIGURE 18</u> : REPRESENTATION DE LA LIGNEE CELLULAIRE DES CELLULES SOUCHES NEURALES DE L'EMBRYOGENESE A L'AGE ADULTE (KRIEGSTEIN AND ALVAREZ-BUYLLA, 2009).	76
<u>FIGURE 19</u> : NATURE GLIALE DES CELLULES SOUCHES NEURALES IMPLIQUEES DANS LE NEURODEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET ADULTE (KRIEGSTEIN ET ALVAREZ BULLA, 2009).....	78

FIGURE 20 : SCHEMA REPRESENTATIF DES DIFFERENTS PROGENITEURS NEURONAUX ET LEUR LIGNAGE DANS LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET ADULTE DU GYRUS DENTE DE L'HIPPOCAMPE (KRIEGSTEIN ET ALVAREZ BULLA, 2009).....	81
FIGURE 21 : PROCESSUS DE NEUROGENESE ADULTE AU SEIN DE LA ZONE SOUS VENTRICULAIRE (ZSV).....	83
FIGURE 22 : SCHEMAS REPRESENTATIFS DE LA NEUROGENESE CHEZ LA SOURIS ADULTE.....	84
FIGURE 23 : RESUME DES ETAPES DE MATURATION NEURONALE DANS LE GYRUS DENTE DE L'HIPPOCAMPE (D'APRES ZHAO ET AL, 2006).....	85
FIGURE 24 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES POPULATIONS DE CELLULES IMPLIQUEES DANS LA NEUROGENESE ADULTE HIPPOCAMPALE (D'APRES ENCINAS ET ENIKOLOPOV, 2008).....	86
FIGURE 25 : TABLEAUX RECAPITULATIFS DES REGULATIONS INTRINSEQUES ET EXTRINSEQUES DES PHASES PRECOCES ET TARDIVES DE LA NEUROGENESE ADULTE (D'APRES PATHANIA ET BORDAY, 2010).....	90
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TECHNIQUE DE REVELATION DU WESTERN BLOT QUANTITATIF UTILISEE.....	110
FIGURE 27 : EXEMPLE DE MESURE DE LA LINEARITE DU SIGNAL DE L'ANTICORPS EN FONCTION DE LA QUANTITE PROTEIQUE DEPOSEE.....	111
FIGURE 28 : REPRESENTATION ANATOMIQUE SCHEMATIQUE DES COUPES CORONALES SELECTIONNEES POUR NOTRE ETUDE D'APRES L'ATLAS « THE MOUSE BRAIN » DE G.PAXINOS.....	113
FIGURE 29 : REPRESENTATION ANATOMIQUE SCHEMATIQUE DES COUPES CORONALES SELECTIONNEES POUR L'ETUDE DU FORNIX D'APRES L'ATLAS « THE MOUSE BRAIN » DE G.PAXINOS.....	114
FIGURE 30 : ANALYSE PAR IMAGERIE A RESONANCE MAGNETIQUE (IRM) DU VOLUME CEREBRAL DES SOURIS S ^{+/+} ET S ^{-/-}	128
FIGURE 31 : QUANTIFICATION PROTEIQUE, PAR LA METHODE BCA, DES BROYATS DE CERVEAUX DE SOURIS S ^{+/+} , S ^{-/-} ET S ^{+/-} , DE FOND GENETIQUE 129SvPas/Bl6.....	129
FIGURE 32 : QUANTIFICATION PAR WESTERN BLOT DE MARQUEURS UBIQUITAIRES, NEURONAUX, GLIAUX ET MYELINIQUES CONTENUS DANS LES CERVEAUX DE SOURIS S ^{+/+} ET S ^{-/-} . PARTIE 1.....	131
FIGURE 33 : QUANTIFICATION PAR WESTERN BLOT DE MARQUEURS NEURONAUX NEURITIQUES ET SYNAPTIQUES CONTENUS DANS LES CERVEAUX DE SOURIS S ^{+/+} , S ^{-/-} . PARTIE 2.....	136
FIGURE 34 : SCHEMAS REPRESENTATIFS DU SYSTEME LIMBIQUE HUMAIN.....	140
FIGURE 35 : DIFFERENCES ANATOMIQUES ET MORPHOMETRIQUES ENTRE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}).....	142
FIGURE 36 : REPRESENTATION PICTURALE DE LA MORPHOLOGIE DU FORNIX CHEZ L'HUMAIN ET LE RONGEUR.....	145
FIGURE 37 : DIFFERENCES ANATOMIQUES ET MORPHOMETRIQUES DU FORNIX DORSAL, DU CORPS DU FORNIX ET DE LA PARTIE PROXIMALE DU FORNIX POST-COMMISSURAL ENTRE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}).....	147
FIGURE 38 : ANALYSE MORPHOLOGIQUE DU FORNIX ENTRE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}).....	149
FIGURE 39 : ETUDE MORPHOLOGIQUE DES FIBRES AXONALES DU FORNIX DE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}) PAR TRAÇAGE LENTIVIRAL. PARTIE 1.....	152
FIGURE 40 : ETUDE MORPHOLOGIQUE DES FIBRES AXONALES DU FORNIX DE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}) PAR TRAÇAGE LENTIVIRAL. PARTIE 2.....	153
FIGURE 41 : ANALYSE DE L'INTEGRITE DES FIBRES AFFERENTES DU CORPS MAMILLAIRE CHEZ LES SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}).....	155

FIGURE 42 : REPRESENTATION DE LA FORMATION HIPPOCAMPALE ET DES REGIONS PARAHIPPOCAMPALES DU CERVEAU DE RAT (VAN STRIEN ET AL., 2009).....	156
FIGURE 43 : SCHEMA REPRESENTATIF DES DIFFERENTES PROJECTIONS DES 4 REGIONS DU SUBICULUM.	157
FIGURE 44 : DIFFERENCES ANATOMIQUES ET MORPHOMETRIQUES DU SUBICULUM DORSAL ENTRE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}), INVALIDEES (S ^{-/-}) ET HETEROZYGOTES (S ^{+/-}).	159
FIGURE 45 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES ETAPES ET DES TYPES CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS DE LA NEUROGENESE ADULTE.....	166
FIGURE 46 : ETUDE DE L'EXPRESSION DE STOP DANS L'HIPPOCAMPE PAR IMMUNOHISTOCHEMIE DANS LA SOURIS S ^{+/+} ET PAR TEST ENZYMATIQUE DE LA β -GALACTOSIDASE, GENE RAPPORTEUR SOUS LE PROMOTEUR DE LA STOP, DANS LA SOURIS S ^{+/-}	167
FIGURE 47 : ANALYSE DU PATRON D'EXPRESSION DE LA β -GALACTOSIDASE DANS LA ZONE GERMINATIVE DU GYRUS DENTE DE L'HIPPOCAMPE, CHEZ LA SOURIS S ^{+/-}	169
FIGURE 48 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PATRON D'EXPRESSION DE LA PROTEINE STOP DANS LES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA NEUROGENESE ADULTE DU GYRUS DENTE DE L'HIPPOCAMPE.	171
FIGURE 49 : ANALYSE DU PATRON D'EXPRESSION DE LA β -GALACTOSIDASE DANS LA ZONE SOUS VENTRICULAIRE ET LE BULBE OLFACTIF CHEZ LA SOURIS S ^{+/-}	172
FIGURE 50 : ANALYSE DE LA NEUROGENESE ADULTE DE LA ZONE SOUS VENTRICULAIRE (ZSV) DES SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}).	174
FIGURE 51 : ANALYSE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES SOUCHES ET PROGENITEURS PROLIFERANT DANS LA ZSG DU GYRUS DENTE ET DANS L'HILUS DE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}) PAR IMMUNOHISTOCHEMIE	177
FIGURE 52 : DOSAGE DU BDNF DANS L'HIPPOCAMPE DE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}) PAR LA TECHNIQUE D'ELISA.	179
FIGURE 53 : ANALYSE DU NOMBRE IN FINE DE NEURONES NOUVELLEMENT GENERES DANS LE GYRUS DENTE DE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}).....	180
FIGURE 54 : ANALYSE DU NOMBRE DE NEUROBLASTES (DCX ⁺) ET NEURONES IMMATURES NEOFORMES DANS LE GYRUS DENTE DE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}).	182
FIGURE 55 : ANALYSE DU NOMBRE ET DE LA PERSISTANCE DES PROLONGEMENTS DENDRITIQUES DES NEURONES IMMATURES DU GYRUS DENTE DE SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}).	185
FIGURE 56 : ANALYSE, PAR IMMUNOFLUORESCENCE, DU PATRON D'INFECTION DU RETROVIRUS-GFP D'UNE CULTURE PRIMAIRE D'HIPPOCAMPE D'EMBRYONS DE SOURIS A DIFFERENTS TEMPS POST-INFECTION.....	187
FIGURE 57 : ETUDE DE LA CINETIQUE DE LA MATURATION DES NEURONES IMMATURES NEOFORMES DANS LE GYRUS DENTE DES SOURIS SAUVAGES (S ^{+/+}) ET INVALIDEES (S ^{-/-}) PAR INFECTION RETROVIRALE-GFP.	189

7.2 Table des tableaux

TABLEAU 1 : GENERATION DES SOURIS INVALIDEES POUR LE GENE STOP SELON LES FONDS GENETIQUES UTILISES.	106
TABLEAU 2 : ANTICORPS PRIMAIRES UTILISES.	108
TABLEAU 3 : ANTICORPS SECONDAIRES UTILISES.	108

7.3 Article 1: STOP proteins contribute to the maturation of the olfactory system

7.4 Article 2: The deletion of the microtubule-associated STOP protein affects the serotonergic mouse brain network