

Origine embryonnaire des cellules souches neurales adultes du pallium de poisson zèbre.

Soutenue par Lara Dirian
le 13 novembre 2014

RESUME THESE

Les cellules souches neurales adultes, définies par leur capacité d'auto-renouvellement qui signifie qu'elles sont capables de produire des cellules identiques à elles-mêmes, et leur caractère multipotent permettant la production de nouveaux neurones et cellules gliales à l'échelle de la cellule unique dans le cerveau adulte.

Chez les mammifères, des cellules souches neurales adultes sont présentes dans deux régions de la partie la plus antérieure du cerveau, le télencéphale : la zone sous-épendymaire (SEZ) du ventricule latéral et la zone sub-granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe. Ces deux populations restreintes de cellules souches produisent de nouveaux neurones au stade adulte par des cascades neurogéniques similaires à savoir l'activation de cellules souches neurales qui se divisent et produisent des progéniteurs intermédiaires engagés dans la voie neurogénique, qui vont ensuite se différencier en nouveaux neurones. Ces cellules souches neurales ont majoritairement des caractéristiques de cellules de glie radiaire et sont maintenues au sein de niches incluant différents types cellulaires comme par exemple dans le cas de la SEZ les cellules épendymaires bordant le ventricule.

Contrairement aux mammifères, dans le télencéphale de poisson zébré, les cellules souches neurales adultes sont nombreuses et bordent directement le ventricule ; aucune couche de cellules épendymaires étant présentes dans cette partie du cerveau du poisson zèbre. Elles présentent des caractéristiques de cellules gliales radiaires et expriment des marqueurs tels que GFAP (Glial fibrillary acidic protein), BLBP (Brain-lipid-binding protein) ou GS (Glutamine synthase), impliqués dans la fonction gliale de ces cellules. Elles sont principalement quiescentes mais produisent de nouveaux neurones au stade adulte au travers d'une étape de production de neuroblastes, équivalent aux progéniteurs intermédiaires des mammifères.

Comme chez les mammifères, les cellules de glies radiaires sont présentes dans le cerveau embryonnaire du poisson zèbre, et servent de progéniteurs au cours de la construction du cerveau, et en particulier du télencéphale. Ces cellules dérivent d'un autre type cellulaire plus précoce, les cellules neuroépithéliales qui composent le système nerveux central, elles-même issues de cellules de l'ectoderme orientées au cours de la gastrulation vers un destin neurale. Les cellules neuroépithéliales sont caractérisées par une orientation apico-basale et leurs noyaux sont soumis à une migration interkinétique impliquée dans la progression de ces cellules dans le cycle cellulaire, processus nécessaire à la neurogenèse embryonnaire et leur maintien. Elles expriment des marqueurs de progéniteurs neuraux tels que Sox2 ou Musashi1.

Chez la souris, la transition entre les cellules neuroépithéliales et les cellules gliales radiaires se fait progressivement dans le télencéphale entre les stades de développement E12.5-E16.5 suivant un gradient allant du pôle antéro-latéral au pôle postéro-médian. Outre l'induction de l'expression de gènes impliqués dans le caractère glial des cellules de glies radiaires, cette transition est associée à une neurogenèse accrue et un changement dans le type de division effectué par les progéniteurs neuraux, avec les cellules de glies radiaires générant principalement des neurones par divisions asymétriques.

Au cours du développement embryonnaire, les cellules neuroépithéliales, et plus tard les cellules de glies radiaires, sont soumises à de nombreux signaux qui régissent l'induction et la régionalisation du tissu neural précoce. En effet, plusieurs centres organisateurs embryonnaires affinent le destin des progéniteurs suivant leur position antéro-postérieure mais aussi dorso-ventrale, et découpent dans un premier temps le tube neural en différentes grandes régions, à savoir : le cerveau antérieur, le cerveau moyen, le cerveau postérieur et la moelle épinière. Le cerveau antérieur est ensuite subdivisé en diencephale, œil, hypothalamus, et antérieurement, le télencéphale. Ce dernier comprend enfin une subdivision dorsale, le pallium, une subdivision ventrale, le subpallium, et participe à la genèse du bulbe olfactif. Contrairement à la souris dans laquelle le pallium se développe suivant une invagination, le pallium du poisson zèbre présente une structure évertée impliquant que les régions homologues aux structures des plus médianes présentes chez la souris se retrouvent dans le pallium latéral du poisson zèbre. Le pallium des mammifères comprend des structures essentielles dans les fonctions cognitives telles que le cortex et l'hippocampe. Elles se forment respectivement dans le pallium embryonnaire à partir de deux territoires différents, le pallium dorsal et le pallium médian ; et en lien avec le gradient latéro-médian de formation des cellules gliales radiaires et de neurogenèse, le développement du cortex et de l'hippocampe est décalé dans le temps, avec la neurogenèse corticale démarrant celle de l'hippocampe, ce dernier étant la dernière structure du pallium à être générée.

Cette hétérogénéité concernant l'activité neurogénique des progéniteurs au cours du développement indique que différents facteurs moléculaires sont impliqués d'une part dans le maintien de ces cellules, et d'autre part dans le contrôle de leur activité neurogénique ; et la famille des gènes *Hes/her* remplit cette fonction. Les gènes *Hes/her* appartiennent à la famille des facteurs bHLH (contenant un domaine

« basic helix-loop-helix ») – Orange (contenant un domaine « Orange »), qui comprennent aussi les facteurs Hey, Helt et Stra13/Dec. Les facteurs Hes des mammifères (et leur orthologues *her* chez le poisson zèbre), sont des répresseurs transcriptionnels qui soit se fixent sur le promoteur de leurs gènes cibles et recrutent des co-répresseurs, soit inhibent de manière passive en séquestrant des co-activateurs transcriptionnels responsable de la transcription des gènes cibles.

Chez la souris et le poisson zèbre, les gènes *Hes/her* sont exprimés dans les progéniteurs neuraux et sont impliqués dans leur maintien au cours du développement. Les principaux gènes cibles des gènes *Hes/her* dans le système nerveux correspondent aux gènes proneuraux responsables de la différenciation des progéniteurs en neurones.

Chez le poisson zèbre, deux catégories de gènes *her* sont décrites en fonction de leur sensibilité à la voie de signalisation Notch et définissent deux types de progéniteurs neuraux embryonnaires. La première est composée des gènes *her* canoniques, dont le premier exemple est le gène *her4*. Ces gènes sont des cibles directes de la voie de signalisation Notch et caractérisent les progéniteurs neuraux embryonnaires impliqués dans la neurogenèse précoce, aussi appelés les « clusters proneuraux ». La seconde catégorie concerne les gènes *her* non-canoniques, par exemple *her6* et *her9*, et présente une régulation particulière par la voie Notch ; leur expression n'est pas dépendante de celle-ci mais une suractivation de la voie Notch entraîne leur inhibition. Cette deuxième sous-population de gène *her* est exprimée dans des progéniteurs neuraux dans lesquels la neurogenèse est retardée, souvent présents au niveau des frontières du cerveau en développement qui servent de centres organisateurs, exprimant donc plusieurs composants de différentes voies de signalisation. Cette population de progéniteurs est appelée « pools de progéniteurs ». Les « clusters proneuraux » et les « pools de progéniteurs » définissent donc deux catégories distinctes de progéniteurs neuraux embryonnaires dans le cerveau de poisson zèbre en développement.

Chez la souris, deux catégories similaires de progéniteurs sont caractérisés : les progéniteurs neurogéniques des « compartiments » (équivalent aux « clusters proneuraux ») et les progéniteurs non-neurogéniques des « frontières » (équivalent aux « pools de progéniteurs »). Néanmoins, des différences concernant le type de gène *Hes/her* qu'ils expriment existent entre la souris et le poisson zèbre. En effet, s'il semble qu'ils existent des gènes *Hes* indépendants de la voie Notch, tel que *Hes3*

exprimé dans les progéniteurs neuraux non-neurogéniques avant l'émergence de la voie Notch dans ces régions, et des gènes Hes dépendant de la voie Notch tel que Hes5 (orthologue de *her4*) et présent dans les régions neurogéniques, des gènes Hes exprimés dans les deux types de progéniteurs mais qui présentent des profils d'expressions différents en fonction du contexte cellulaire (« compartiment » / « frontière ») sont aussi rapportés. En effet, Hes1 (orthologue du gène *her6*), fait partie de cette catégorie de gène Hes. S'il présente une expression stable et indépendante de la voie Notch dans les progéniteurs non-neurogéniques, son expression semble osciller dans les progéniteurs neurogéniques, sous l'influence des composants de la voie de signalisation Notch qui oscillent également mais aussi due à l'auto-inhibition qu'il exerce sur sa propre expression. Cette oscillation serait impliquée dans la progression du progéniteur dans le cycle cellulaire et lui conférerait une capacité neurogénique.

Les profils d'expression de ces différents gènes Hes/*her* définissent une hétérogénéité dans les progéniteurs neuraux embryonnaires et suggère que leur destin puisse être différent dans le cerveau adulte, et en particulier concernant leur contribution à la formation des cellules souches neurales adultes. Peu de choses sont aujourd'hui connues concernant l'origine embryonnaire des cellules souches neurales adultes. Quelques études utilisant des techniques de lignages cellulaires inducibles chez la souris ont investigué la contribution de populations de cellules répondant à différentes voies de signalisation, telles que les voies Shh ou Wnt, et ont pu montrer que des cellules embryonnaires activées par ces différents signaux participent à la formation des cellules souches neurales de la SEZ et de la SGZ, avec une formation plus tardive des cellules souches de l'hippocampe. D'autre part, des expériences de lignage permanent de cellules exprimant des marqueurs régionaux comme *Emx1* ont montré de la même manière que ces cellules participent à la formation de sous-régions de la SEZ.

Néanmoins, toutes ces études n'ont pas caractérisés l'« état progéniteur » des cellules embryonnaires tracées et leur activité neurogénique.

Cette question centrale de la contribution des progéniteurs neuraux embryonnaires à l'émergence des cellules souches neurales adultes m'a permis d'articuler ma thèse autour de différentes questions: quelle sont les populations de progéniteurs embryonnaires à l'origine embryonnaire des cellules souches neurales adultes,

quelles sont les étapes nécessaires à leur formation et à leur maintien au cours du développement.

Nous nous sommes donc dans un premier temps intéressés à la contribution des progéniteurs neurogéniques des « cluster proneuraux » du pallium embryonnaire à la formation des cellules souches neurales adultes dans le pallium de poisson zèbre. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie génétique conditionnelle Cre/lox dirigée par le promoteur *her4* (*her4:cre^{2ERT2}*, *ubiii:loxP-GFP-loxP-mcherry*) permettant, à l'aide d'un traitement pharmacologique avec un agent analogue aux oestrogènes le tamoxifène, de contrôler dans le temps la recombinaison et donc de tracer uniquement la descendance d'une population de progéniteur exprimant le gène *her4* au stade de développement d'intérêt. Dans un premier temps, le lignage des progéniteurs exprimant *her4* aux stades de développement embryonnaires (jusqu'à 4 jours de développement), nous ont indiqué que ceux-ci ne génèrent qu'une sous-population des cellules souches neurales adulte du pallium, celles situées dans le pallium dorso-médian. Ainsi, seules les cellules souches adultes situées dans cette région dérivent de progéniteurs neuraux actifs chez l'embryon précoce. En analysant la descendance des cellules exprimant *her4* précocement à différents stades post-embryonnaires (analyse à 5 jours, 20 jours et 1 mois après fécondation), j'ai également montré pour la première fois que le pallium latéral est formé progressivement après 5 jours de développement. Ceci révèle une hétérochronie majeure dans la formation du pallium, non suspectée jusqu'à maintenant, avec la formation du pallium dorso-médian puis la genèse du pallium latérale.

Nous nous sommes donc ensuite intéressés à la population de progéniteurs embryonnaires négative pour l'expression du gène *her4* qui serait à l'origine des cellules souches neurales adultes du pallium latéral. J'ai tout d'abord cherché à déterminer le nombre de progéniteurs précoces contribuant à la formation de la zone ventriculaire latérale. Pour cela, j'ai dans un premier temps utilisé la technologie génétique zebraBow pour marquer les progéniteurs individuels de différentes couleurs et suivre leur descendance. L'analyse au stade adulte de poissons *hsp70:Cre*, *ubi:zebraBow* ayant subi un heat shock à 2 jours post-fertilisation montrent que le pallium latéral ne dérive que de 4 ou 5 cellules progénitrices. Ces résultats ont été confirmés par une deuxième méthode basée sur l'utilisation de tamoxifène sur des embryons *ubi:cre^{ERT2}*, *ubiii:loxP-GFP-loxP-mcherry* exprimant de

manière mosaïque la Cre^{ERT2}, un petit nombre de larges clones sont alors formés dans la partie latérale du pallium et s'étendent de la partie antérieure du cerveau jusqu'à au milieu du cerveau voir jusqu'à la partie postérieure.

Nous avons ensuite cherché à déterminer la localisation des progéniteurs à l'origine de ces grands clones latéraux. L'analyse de l'expression du gène *her4* dans le télencéphale embryonnaire nous a indiqué que la plaque du toit du télencéphale faisait partie des région négative pour ce gène, et faisait donc de cette région un bon candidat. En l'absence d'outil génétique ciblant cette population, j'ai développé une technique de traçage conditionnel utilisant un dérivé « cagé » du tamoxifène, le cyclofène, récemment mis au point par l'équipe de Ludovic Julien. L'activation par laser du cyclofen cagé, spécifiquement dans différentes sous-régions du télencéphale d'embryons doublement transgéniques *ubi:cre^{ERT2}; ubiIII:loxP-GFP-loxP-mcherry*, m'a permis de montrer que les progéniteurs embryonnaires à l'origine des cellules souches neurales adultes du pallium latéral sont situés dans le toit du télencéphale précoce –à 30hpf- à la limite entre le toit et le pallium embryonnaire.

J'ai ensuite caractérisé cette population de cellules et ai pu montrer que ces progéniteurs sont des cellules neuroépithéliales, expriment des composants de plusieurs voies de signalisation tels que Wnt8b, Wnt3a, BMP6, ou FGF8, mais aussi des gènes *her* non-induits par la voie Notch, des gènes *her* non-canonique, tels que *her6* et *her9*. Cette voie, impliquée dans de nombreux processus de développement, est cruciale pour le maintien des progéniteurs neurales embryonnaires et des cellules souches neurales adultes chez la souris ; par des traitements pharmacologiques inhibiteurs de la voie de signalisation Notch utilisant le LY411575, j'ai montré que ces progéniteurs ne sont pas maintenus par cette voie de signalisation, contrairement aux cellules générant les cellules souches neurales adultes localisées dans le pallium dorso-médian. Tous ces critères indiquent que les cellules souches du pallium latéral proviennent de progéniteurs issus de « pools de progéniteurs » présents dans le toit du télencéphale embryonnaire.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai mis ainsi en évidence pour la première fois l'émergence de deux populations différentes de cellules souches neurales adultes dans le télencéphale de poisson zèbre, populations dérivant de deux populations de progéniteurs de longue durée spatialement distincts : les cellules souches neurales du pallium dorso-médian dérivant de « cluster proneuraux » alors que les cellules souches du pallium latéral proviennent de « pool de progéniteurs », tous deux

présents dans le télencéphale embryonnaire. La mise en place de ces deux populations de cellules souches est séquentielle au cours du développement et conduit à une hétérochronie dans la formation du pallium du poisson zèbre.

Nous avons, dans un second temps, cherché à comprendre les étapes de formation des cellules souches neurales adultes et étudiant particulièrement la mise en place de celle-ci dans le pallium latéral. Les cellules souches neurales adultes du pallium de poisson zèbre expriment le gène *her4*, tant dans la partie latérale que dans la partie dorso-médiane, et nous avons mis en évidence que les progéniteurs à l'origine des cellules souches latérales étaient *her4*-négatifs dans un embryon précoce. Ces deux constatations impliquent qu'au cours du développement, *her4* commence à être exprimé dans les progéniteurs embryonnaires latéraux. Des traitements au tamoxifène effectués à 5 jours et plus tardivement sur des poissons juvéniles (*her4:cre^{2ERT2}*, *ubiii:loxP-GFP-loxP-mcherry*) démontrent que les cellules souches neurales du pallium latéral expriment progressivement *her4 de novo* à partir de ces stades avec un gradient dorso-ventral et antéro-postérieur d'activation. L'acquisition de cette expression est concomitante avec le début de la neurogenèse dans ce domaine.

her4 étant une cible de la voie Notch, j'ai ensuite étudié le rôle de cette voie de signalisation dans le maintien des progéniteurs latéraux aux stades juvéniles. Des traitements pharmacologiques utilisant le LY411575 ont ainsi été couplés avec des expériences de lignage des progéniteurs *her4*. Ces expériences réalisées à des stades à des stades juvéniles (5 et 15 jours post-fertilization) montrent que, contrairement aux stades embryonnaires, les progéniteurs latéraux deviennent, dans un second temps, dépendants de Notch pour leur maintien. De manière intéressante, l'analyse au stade juvénile du lignage des progéniteurs exprimant *her4* chez l'embryon indique que les progéniteurs latéraux *her4*-positifs contiennent des cellules neuroépithéliales à 15 jours post-fertilization et sont même entièrement composés de cellules neuroépithéliales à 5 jours post-fertilization.

Tous ensemble, ces résultats indiquent que les cellules souches latérales sont formées à partir de progéniteurs neuroépithéliaux présentant des caractéristiques des « pool de progéniteurs » dans le pallium embryonnaire, mais qu'une partie de ces cellules neuroépithéliales commencent à exprimer *her4* aux stades juvéniles, puis génère des cellules de glie radiaire, les cellules souches neurales adultes.

Il est intéressant de noter qu'une petite population de cellules neuroépithéliales non-*her4* reste tout au long du développement et chez l'adulte à l'extrême limite postérieure de la zone ventriculaire latérale ; et nous avons pu montrer que ces cellules continuent de générer des cellules de glie radiaire chez l'adulte.

La deuxième partie de ma thèse a donc été consacrée à montrer la séquence de progéniteurs à l'origine des cellules souches du pallium latéral et la production continue au cours de la vie du poisson de ces dernières par une petite population de cellules présentant des caractéristiques des « pools de progéniteurs », toujours présentes dans la partie postérieure du pallium latérale.

Ces travaux réalisés au cours de mes trois années de thèse ont abouti à un article scientifique publié en juillet 2014 dans le journal *Developmental Cell*.

Enfin la dernière partie de mon travail à consister en l'étude de la formation de la partie neuronale du pallium. La stratégie utilisée lors de l'étude de l'origine embryonnaire des cellules souches neurales adultes nous permet aussi d'apprécier la contribution des cellules exprimant *her4* à la production neuronale dans le pallium. En effet, le transgène rapporteur *ubiii:loxP-GFP-loxP-mcherry* utilisé pour le lignage des progéniteurs positifs pour le gène *her4* est exprimé dans toutes la descendance des cellules tracées, y compris dans les neurones, et permet donc d'étudier la contribution des cellules *her4* à la construction du pallium de poisson zèbre.

L'analyse du lignage au stade adulte des cellules exprimant le gène *her4* à différents stades de développement indique que les neurones s'organisent dans le parenchyme (partie non-ventriculaire du pallium) suivant deux gradients. Un premier gradient ventro-dorsal reflétant l'âge de création des neurones est présent dans le pallium, avec les neurones vieux localisés en ventral et les neurones jeunes (venant juste d'être produit par la zone ventriculaire) localisé en dorsal. Un deuxième gradient, dû au décalage d'activation des progéniteurs palliaux latéraux par rapport aux progéniteurs dorso-médians, illustre la composition différentielle des deux territoires en terme de neurones. En effet, il existe aussi un gradient medio-latéral d'âge des neurones avec la région dorso-médiane composée de neurones jeunes et âgés, alors que le pallium latéral est composé de neurones formés à partir de 15jour post-fertilization.

Ces deux gradients reflètent une organisation du pallium en « couches », avec un gradient medio-latéral de développement. Ces couches, bien qu'étant appelées ainsi,

ne sont pas visibles morphologiquement et ne sont donc pas à ce titre comparable avec les couches du cortex de souris. Néanmoins, bien qu'inversés, les gradients régissant la construction du pallium de poisson zèbre et de souris sont comparables impliquant des similitudes dans les processus moléculaire orchestrant la construction du pallium chez ces deux espèces. Dans ce cadre, nous avons pu montrer que la région la plus médiane du cerveau embryonnaire de souris se développait de manière similaire au pallium latéral du poisson zèbre. Cette région donne naissance à l'hippocampe chez les mammifères ; notre étude complète des résultats précédents et suggère que la région latérale du pallium du poisson zèbre serait homologues avec l'hippocampe de souris.

Cette thèse a donc permis de montrer l'origine embryonnaire double des cellules souches neurales adultes du pallium de poisson zèbre, son impact sur la dynamique de formation du cerveau et sur l'organisation des neurones du pallium de poisson zèbre.