



**HAL**  
open science

# Expression et sécrétion d'Otx2 par les plexus choroïdes, nouvelle évidence d'un contrôle non-cellulaire- autonome de la neurogenèse adulte. Rôles physiologiques d'Otx2

Anabelle Planques

## ► To cite this version:

Anabelle Planques. Expression et sécrétion d'Otx2 par les plexus choroïdes, nouvelle évidence d'un contrôle non-cellulaire- autonome de la neurogenèse adulte. Rôles physiologiques d'Otx2. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066501 . tel-01522796

**HAL Id: tel-01522796**

**<https://theses.hal.science/tel-01522796v1>**

Submitted on 15 May 2017

**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.

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale n°158 Cerveau Cognition Comportement

*Equipe Développement et Neuropharmacologie*

*Centre Interdisciplinaire de Recherche en Biologie, Collège de France*

Expression et sécrétion d'Otx2 par les plexus choroïdes,  
nouvelle évidence d'un contrôle non-cellulaire-  
autonome de la neurogenèse adulte

*Rôles physiologiques d'Otx2*

Par **Anabelle Planques**

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par **Ariel Di Nardo**

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2016

Devant un jury composé de :

Pr **Alain Trembleau**, Professeur, en qualité de président du jury

Dr **Jean-François Ghersi-Egea**, Directeur de recherche, en qualité de rapporteur

Dr **Olivier Raineteau**, Directeur de recherche, en qualité de rapporteur

Pr **Andreas Faissner**, Professeur, en qualité d'examinateur

Dr **Stéphane Nédelec**, Chargé de Recherche, en qualité d'examinateur



*Une page se tourne  
Et il ne faut pas oublier de regarder derrière*



# Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ces travaux de recherche et à mon développement scientifique et personnel.

Tout d'abord, je remercie les Drs. et Prs. Alain Trembleau d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, mais aussi pour les discussions que nous avons eu depuis le master 2, Jean-François Gherzi-Egea et Olivier Raineteau pour le temps consacré à évaluer et discuter mes travaux de thèse et mon manuscrit, et enfin Andreas Faissner et Stéphane Nédelec d'évaluer et discuter mes travaux.

Je remercie la Région Ile-de-France pour son soutien financier dans le cadre de son programme de soutien doctoral.

Merci à Alain Prochiantz de m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour les conseils et avis et de m'avoir permis de découvrir la recherche au Collège de France et autour du monde grâce aux congrès et conférences scientifiques. Tu as su maintenir ma motivation dans les coups durs et donner de bonnes orientations au projet.

I want to express my most sincere thanks to Ariel Di Nardo for his supervision during four years. First, thank you for giving me the chance to work on choroid plexus and adult neurogenesis, which are very interesting topics in neurobiology. We learned to work together and had very interesting discussions in the lab and in congresses. You gave me advice, on many subjects, with patience and kindness. You helped me develop my skills and autonomy. You are open-minded, I really liked working with you and I hope you will succeed in developing your ideas and topics. Thank you for your help in English too ;-)

Je remercie tout particulièrement Chantal Dubreuil pour toutes les expériences d'immunomarquage et quantification de la neurogenèse. Tu as passé un temps considérable sur ces techniques et j'espère avoir su te montrer ma

reconnaissance et te motiver sur ce projet. Je n'aurai pas pu développer le projet sans ton aide et j'ai aimé apprendre à travailler avec toi.

Je remercie le personnel de l'école Sup'Biotech, et particulièrement Estelle Mogensen pour m'avoir permis d'enseigner avec elle pendant trois ans où j'ai appris énormément en pédagogie et techniques de laboratoire, mais aussi Ludivine Monceau qui a rendu cela possible. Merci aussi à Thierry Picaud pour tous les conseils prodigués durant mes études et pour m'avoir donné la chance de développer mon propre TD de statistiques qui fut une excellente expérience. Finalement, merci à toutes les personnes impliquées dans cette école, mais aussi aux professeurs du master 2 de biologie intégrative de Paris VI qui m'ont donné l'intérêt pour la science et ses différents aspects.

Un grand merci à Clémence Bernard également. Tu as été de précieux conseil et tu m'as permis de rejoindre le laboratoire en m'aidant à préparer le concours avec Ariel. J'ai apprécié nos pauses café, les soirées ZZ, et tu m'as encore surprise par ta motivation et ta gentillesse en corrigeant mon introduction ! S'il nous arrive d'avoir des incompréhensions, sache que je te souhaite le meilleur et je n'ai pas de doute sur ton futur succès. Encore merci et bon courage ;-)

Merci à toutes les personnes du laboratoire et aux collègues qui m'ont aidé pour les expériences : Joshua, Jessica, Damien, Pat, Eliane, Michel, Raoul, Alain J., Edmond, Valérie, Raju, Julia, Olivia...

Je tiens également à remercier Sandrine Betuing, qui m'a donné la chance et l'envie de découvrir la neurobiologie. Tu m'as appris énormément, toutes les bases des expériences en biologie, de l'écriture (et ce n'était pas gagné) et du travail en équipe. Peut-être aurons-nous l'occasion de réaliser d'autres projets de recherche ensemble ?

Un grand merci à Andrew Tindall, Morgane Gauthier, Franck Yates et Agnès Saint-Paul pour leurs enseignements et conseils et de m'avoir soutenue et motivée dans mon souhait de réaliser un doctorat.

Je remercie toutes les personnes du Collège de France avec qui j'ai pu discuter, développer mes idées, mais aussi passer de bons moments. Tout particulièrement : Richard pour les koalas, les corrections et tout ce qui n'a pas besoin d'être écrit. Jérôme pour toutes les discussions et moments qui m'ont permis de me changer les idées, Glenn et Armelle pour leur folie, conseils, et autres antidotes, Clémentine pour le soutien mutuel dans les montagnes russes de la thèse, Camille pour tous les bons moments, Tiffany qui a su me rappeler l'essentiel. Mais aussi Thibault, Julien, Réda, Marion, Leticia, Nico, Raly...

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai discuté science, principalement en congrès dont Marissa, Wala...

Merci aux personnes m'ayant permis ou aidé à réaliser des expériences: Gwenaelle Le Pen et les plateformes de l'IBENS et de l'institut Curie.

Un remerciement tout particulier à Benjamin. Le M2, les concours, la thèse, mais aussi les vacances... que de chemin ! Je te souhaite bonne chance pour la suite.

Enfin, mes plus grands remerciements à ma famille et à mes amis qui m'ont soutenu depuis le début.





# Sommaire

Remerciements

Sommaire

Liste des abréviations & Mots clés

<b>I- Introduction Partie 1. Les plexus choroïdes sont des sources de facteurs régulant l'homéostasie cérébrale .....</b>	<b>1</b>
<i>I- 1. Le système ventriculaire communique avec l'espace sous-arachnoïdien et contient les plexus choroïdes.....</i>	<i>6</i>
I- 1.a Anatomie du système ventriculaire et localisation des plexus choroïdes.....	6
I- 1.b Structure des plexus choroïdes.....	8
I- 1.c Développement des plexus choroïdes .....	10
<i>I- 2. Le liquide cérébrospinal permet la communication entre le parenchyme et le système périphérique.....</i>	<i>12</i>
I- 2.a Le liquide cérébrospinal est une interface entre les différents fluides du cerveau.....	12
I- 2.b Sources et composition du liquide cérébrospinal .....	19
I- 2.b Sources et composition du liquide cérébrospinal .....	22
<i>I- 3. Rôles des plexus choroïdes et du liquide cérébrospinal .....</i>	<i>25</i>
I- 3.a Les plexus choroïdes participent à la surveillance immunologique du système nerveux central .....	25
I- 3.b Le liquide cérébrospinal permet de détoxifier le cerveau .....	26
I- 3.c Le liquide cérébrospinal permet de transporter des facteurs de signalisation.....	27
<i>I- 4. Implications pathologiques et intérêts thérapeutiques.....</i>	<i>30</i>
I- 4.a Pathologies impliquant les plexus choroïdes .....	30
I- 4.b Les plexus choroïdes et les maladies du vieillissement.....	31
I- 4.c Intérêts thérapeutiques des plexus choroïdes et du liquide cérébrospinal.....	32
<i>I- 5. Conclusion Partie 1.....</i>	<i>34</i>
<b>II- Introduction Partie 2. Les plexus choroïdes, source d'Otx2 dans le cerveau .....</b>	<b>35</b>
<i>II- 1. Les homéoprotéines constituent une classe unique .....</i>	<i>38</i>
II- 1.a Spécificités de l'homéodomaine .....	38
II- 1.b Génération de lignées scFv-homéoprotéine pour l'étude des fonctions du transfert des homéoprotéines.....	40
II- 1.c Rôle des homéoprotéines dans l'établissement et le maintien du système nerveux centrale.....	42
II- 1.d Mécanismes d'action des homéoprotéines.....	43
<i>II- 2. Caractéristiques de l'homéoprotéine Otx2.....</i>	<i>44</i>
II- 2.a Apparition d'Otx2 dans l'évolution .....	44
II- 2.b Rôle d'Otx2 dans le développement du cerveau .....	45
II- 2.c Rôle d'Otx2 dans le développement du système olfactif.....	45
II- 2.d Otx2 est un régulateur du développement des plexus choroïdes .....	48
II- 2.e Otx2 dans le système nerveux central adulte .....	51
II- 2.f Cibles transcriptionnelles identifiées d'Otx2.....	55
II- 2.g Implications pathologiques .....	55
II- 2.h Indications thérapeutiques potentielles.....	57
<i>II- 3. Conclusion Partie 2 .....</i>	<i>57</i>

<b>III- Introduction Partie 3. Les plexus choroïdes sont des régulateurs de la neurogenèse adulte.....</b>	<b>59</b>
<i>III- 1. De nouveaux neurones sont générés dans le cerveau adulte.....</i>	<i>62</i>
III- 1.a La formation de nouvelles cellules dans le cerveau adulte est un élément de la plasticité du cerveau .....	62
III- 1.b Des progéniteurs localisés dans la zone sous-ventriculaire produisent des nouveaux neurones dans le bulbe olfactif de la souris .....	64
III- 1.c Fonctions de la neurogenèse adulte dans le bulbe olfactif .....	70
III- 1.d La neurogenèse adulte au cours de l'évolution .....	72
III- 1.e Déclin de la neurogenèse durant le vieillissement.....	77
<i>III- 2. La niche de la zone sous-ventriculaire fournit un environnement unique pour la neurogenèse adulte.....</i>	<i>79</i>
III- 2.a Composition et interactions dans la niche de la zone sous-ventriculaire .....	79
III- 2.b Composition et interactions dans le courant de migration rostral .....	85
III- 2.c L'étude de la neurogenèse adulte au niveau cellulaire requiert l'utilisation de marqueurs .....	88
<i>III- 3. La matrice extracellulaire est le composant non-cellulaire de la niche.....</i>	<i>89</i>
III- 3.a La matrice extracellulaire dans le cerveau et ses effecteurs.....	89
III- 3.b La matrice extracellulaire de la zone sous-ventriculaire présente des caractéristiques uniques .....	91
III- 3.c Spécialisation de la matrice extracellulaire du courant de migration rostral et du bulbe olfactif.....	95
III- 3.d Les Tenascines régulent la migration des neuroblastes.....	99
III- 3.e La Thrombospondine-4 régule la migration des neuroblastes.....	101
<i>III- 4. Différents types d'astrocytes sont impliqués dans la neurogenèse adulte.....</i>	<i>103</i>
III- 4.a Les cellules souches neurales adultes ont un phénotype astrocytaire et illustrent l'hétérogénéité de la population astrocytaire.....	103
III- 4.b Cellules astrocytaire dans la ZSV.....	104
III- 4.c Les astrocytes associés au courant de migration rostral pourraient constituer un sous-type astrocytaire.....	108
III- 4.d Rôle des astrocytes dans la neurogenèse adulte .....	108
<i>III- 5. Les plexus choroïdes sont des acteurs de la niche neurogénique adulte.....</i>	<i>110</i>
III- 5.a Les plexus choroïdes expriment des molécules de répulsion pouvant guider les neuroblastes .....	110
III- 5.b Les plexus choroïdes peuvent réguler la structure et la prolifération dans la zone sous-ventriculaire .....	112
III- 5.c Hypothèse d'une boucle de régulation entre le liquide cébrospinal et la niche neurogénique de la zone sous-ventriculaire.....	112
<i>III- 6. Intérêt thérapeutique des recherches sur la neurogenèse adulte.....</i>	<i>113</i>
<i>III- 7. Conclusion Partie 3.....</i>	<i>114</i>
<b>Problématique .....</b>	<b>115</b>
<b>IV- Résultats Partie 1. Fonctions d'Otx2 dans les plexus choroïdes adultes et partenaires protéiques.....</b>	<b>117</b>
<i>IV- 1. Introduction.....</i>	<i>119</i>
<i>IV- 2. Publication à soumettre .....</i>	<i>120</i>
<i>IV- 3. Conclusion.....</i>	<i>151</i>
<b>V- Résultats Partie 2. Régulation de la neurogenèse adulte par Otx2 .....</b>	<b>153</b>
<i>V- 1. Introduction.....</i>	<i>155</i>
<i>V- 2. Publication à soumettre.....</i>	<i>156</i>
<i>V- 3. Conclusion.....</i>	<i>173</i>

<b>VI- Discussion</b> .....	<b>175</b>
<i>VI- 1. Analyse des plexus choroïdes adultes et de la fonction cellulaire-autonome d'Otx2</i> .....	178
VI- 1.a Les plexus choroïdes sont hétérogènes et remplissent des fonctions différentes .....	178
VI- 1.b L'expression d'Otx2 dans les plexus choroïdes régule leur homéostasie .....	179
<i>VI- 2. Etude des cibles moléculaires et partenaires d'Otx2</i> .....	181
VI- 2.a Régulation de l'expression des protéines de la matrice extracellulaire par Otx2 .....	181
VI- 2.b Potentielle implication d'Otx2 dans la régulation de l'épissage .....	183
<i>VI- 3. Cibles cellulaires d'Otx2</i> .....	184
VI- 3.a Cellules cibles d'Otx2.....	184
VI- 3.b La matrice extracellulaire comme mécanisme de reconnaissance des cellules cibles.....	186
VI- 3.c Otx2 comme marqueur des astrocytes de la zone sous-ventriculaire et du courant de migration rostrale.....	187
<i>VI- 4. Régulation de la neurogenèse adulte par Otx2</i> .....	188
VI- 4.a Comparaison des études sur les modèles murins Otx2-lox et scFv-Otx2.....	188
VI- 4.b La diminution d'Otx2 doit être aiguë pour modifier la neurogenèse.....	189
VI- 4.c Etude de la régulation de la neurogenèse adulte par le transfert d'Otx2 dans la zone sous-ventriculaire .....	191
VI- 4.d Régulation de la neurogenèse par les cellules de supports.....	192
VI- 4.e Examiner la neurogenèse en embryonnaire et dans l'évolution pour comprendre les fonctions d'Otx2.....	193
<i>VI- 5. Mécanisme de régulation de la neurogenèse adulte par Otx2</i> .....	195
VI- 5.a Une réduction ou un défaut de migration des neuroblastes pourrait causer la diminution de neurogenèse.....	195
VI- 5.b La matrice extracellulaire sécrétée par les astrocytes de support comme régulateur de la migration des neuroblastes.....	197
<b>VII- Annexes</b> .....	<b>201</b>
<i>Annexe A : Etapes du développement de l'épithélium des plexus choroïdes</i> .....	203
<i>Annexe B : Découverte des homéoprotéines</i> .....	205
<i>Annexe C : L'expression des homéoprotéines définit un code pour la régionalisation du système nerveux central</i> .....	205
<i>Annexe D : Les homéoprotéines régulent la neurogenèse embryonnaire en coopération avec des voies métaboliques classiques</i> .....	207
<i>Annexe E : Séquence d'Otx2</i> .....	208
<i>Annexe F : Otx2 induit la partie antérieure du cerveau durant le développement embryonnaire précoce</i> .....	208
<i>Annexe G : Otx2 permet la régionalisation du cerveau et la spécification des progéniteurs</i> .....	210
<i>Annexe H : Otx2 régule la neurogenèse embryonnaire</i> .....	210
<i>Annexe I : Neurogenèse adulte dans l'hippocampe de souris</i> .....	214
<i>Annexe J : Les intégrines sont les principaux récepteurs pour la transduction des signaux provenant de la matrice extracellulaire</i> .....	216
<i>Annexe K : Les métalloprotéases sont des modulateurs de la matrice extracellulaire et de sa signalisation</i> .....	217
<i>Annexe L : L'émergence d'un nouveau domaine de recherche sur la diversité des cellules gliales</i> .....	217
<i>Annexe M : Le manque de marqueurs moléculaires freine la compréhension de l'hétérogénéité des astrocytes</i> .....	218
<i>Annexe N : Co-immunoprécipitation des ARN liés à Otx2</i> .....	218
<b>VIII- Références bibliographiques</b> .....	<b>221</b>



## Liste des Abréviations

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BO : bulbe olfactif

CMR : courant de migration rostral

GAG : glycosaminoglycanes

LCS : liquide cébrospinal

MEC : matrice extracellulaire

miARN : micro ARN

PC : plexus choroïde

scFv : single chain Fragment variable

Tnc : Ténascine-C

Thbs4 : Thrombospondine-4

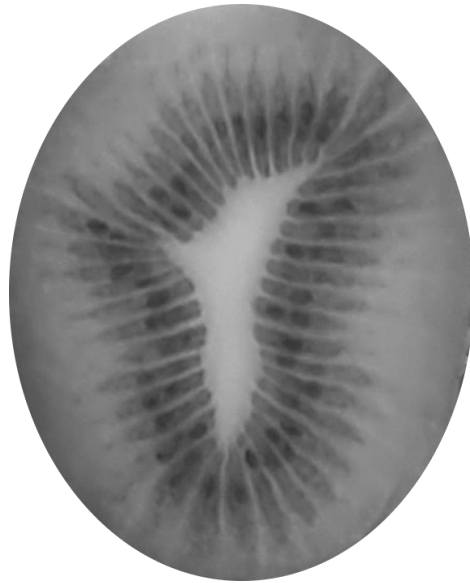
ZSV : zone sous-ventriculaire

## Mots clés

Otx2 ; Plexus choroïdes ; Neurogenèse adulte ; Astrocytes ;  
Matrice extracellulaire ; Fonction non-cellulaire-autonome.



Mais avant ça :



Cette image représente :

(A) Le bulbe olfactif d'une souris ?

(B) Un kiwi en noir et blanc ?

(C) Le bulbe olfactif d'un *Apteryx australis*, d'où le nom commun de cet oiseau (le kiwi) ?





## **I- Introduction Partie 1.**

**Les plexus choroides sont des sources de facteurs  
régulant l'homéostasie cérébrale**



Durant cette thèse, je me suis intéressée au cerveau et sa physiologie. Les plexus choroïdes (PC) produisent le liquide cébrospinal (LCS) qui baigne le cerveau et permet la diffusion des molécules sécrétées par les PC. Le LCS constitue aussi, avec les méninges, la protection — au niveau anatomique — du cerveau. Les PC et le LCS sont donc des éléments essentiels de l'homéostasie cérébrale. Bien qu'ils soient souvent méconnus, ils suscitent un intérêt croissant dans la neurobiologie contemporaine (Emerich *et al.* 2005 ; Skinner *et al.* 2006).

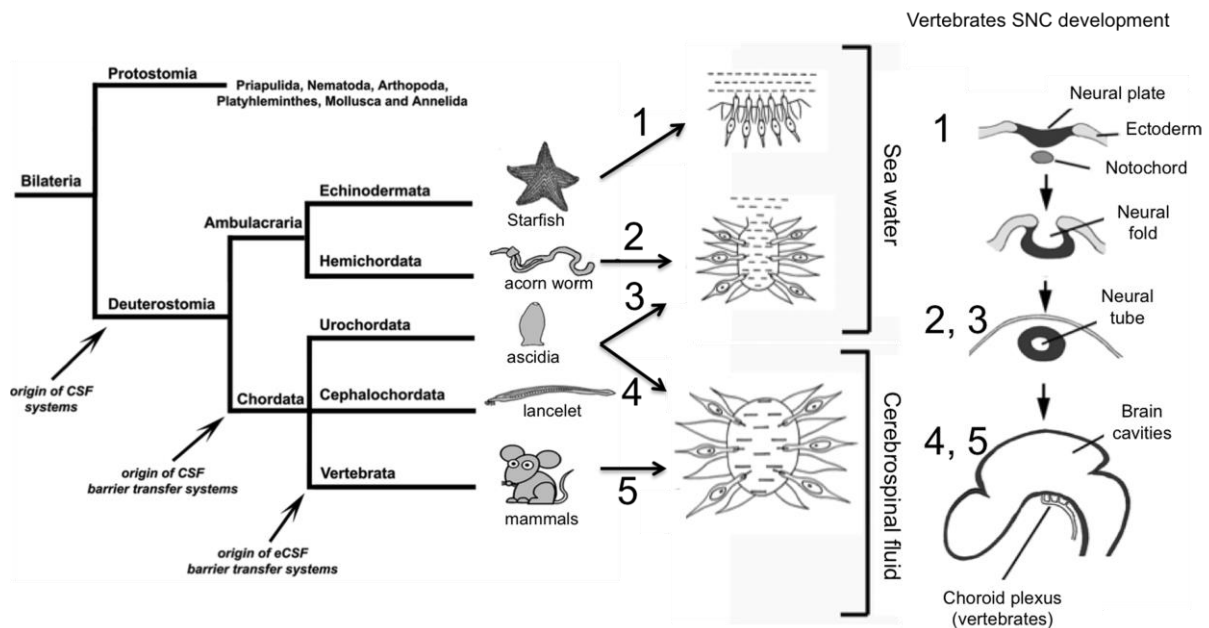
En effet, les PC et le LCS constituent des voies d'entrée dans le système nerveux central. La pénétration de molécules dans le parenchyme cérébral est un enjeu pour l'action des traitements qui doivent, par exemple, agir directement sur les neurones.

La première référence au LCS fut découverte dans des écrits de l'Égypte antique, nommés « papyrus d'Edwin Smith », en référence au collectionneur qui les acheta au XIX<sup>e</sup> siècle. Ce papyrus, qui représente la première référence de chirurgie connue, mentionne les méninges ainsi que le LCS. Hippocrate (IV et V<sup>e</sup> siècle av. J.-C.) décrivit également le LCS en lien avec l'hydrocéphalie (excès de LCS dans les ventricules cérébraux). De la même manière, les PC furent décrits dans la Grèce antique, notamment par Galien (II<sup>e</sup> siècle) et même au III<sup>e</sup> siècle av. J.-C. par Herophilus. La première mention d'une possible sécrétion de LCS par les PC est attribuée à Willis en 1664, et fut prouvée par Dandy au début du XX<sup>e</sup> siècle (Liddelow 2011; Zappaterra & lehtinen 2012).

Depuis, l'apparition et l'évolution du LCS et des PC ont été caractérisées. L'existence de LCS, qui est un fluide formé dans le système nerveux central et présent exclusivement à ce niveau, requiert la formation de cavités nommées ventricules cérébraux. Ceux-ci sont apparus chez les chordés et sont donc présents chez tous les vertébrés (Figure 1). Les PC sont apparus chez les vertébrés et l'ordre de développement et la structure des PC sont conservés (Bill & Korzh 2014; Bueno & Garcia-Fernández 2016).

En plus du développement et de la morphologie des PC, la composition du LCS embryonnaire humain partage de nombreuses similarités avec le LCS issu d'embryons de rats suggérant la conservation d'un rôle important de ce système pour l'homéostasie cérébrale (Zappaterra *et al.* 2007).

Dans cette partie seront décrits les PC, la formation du LCS et leurs rôles respectifs pour la mise en place et l'homéostasie du cerveau. Nous commencerons par une description du système ventriculaire et des PC qu'il contient afin d'appréhender leurs capacités de signalisation dans le système nerveux central. Nous détaillerons alors les mouvements du LCS qui permettent la distribution de facteurs dans le cerveau. Les divers rôles des PC et du LCS seront ensuite exposés et les implications thérapeutiques de ce système seront abordées dans la dernière section.



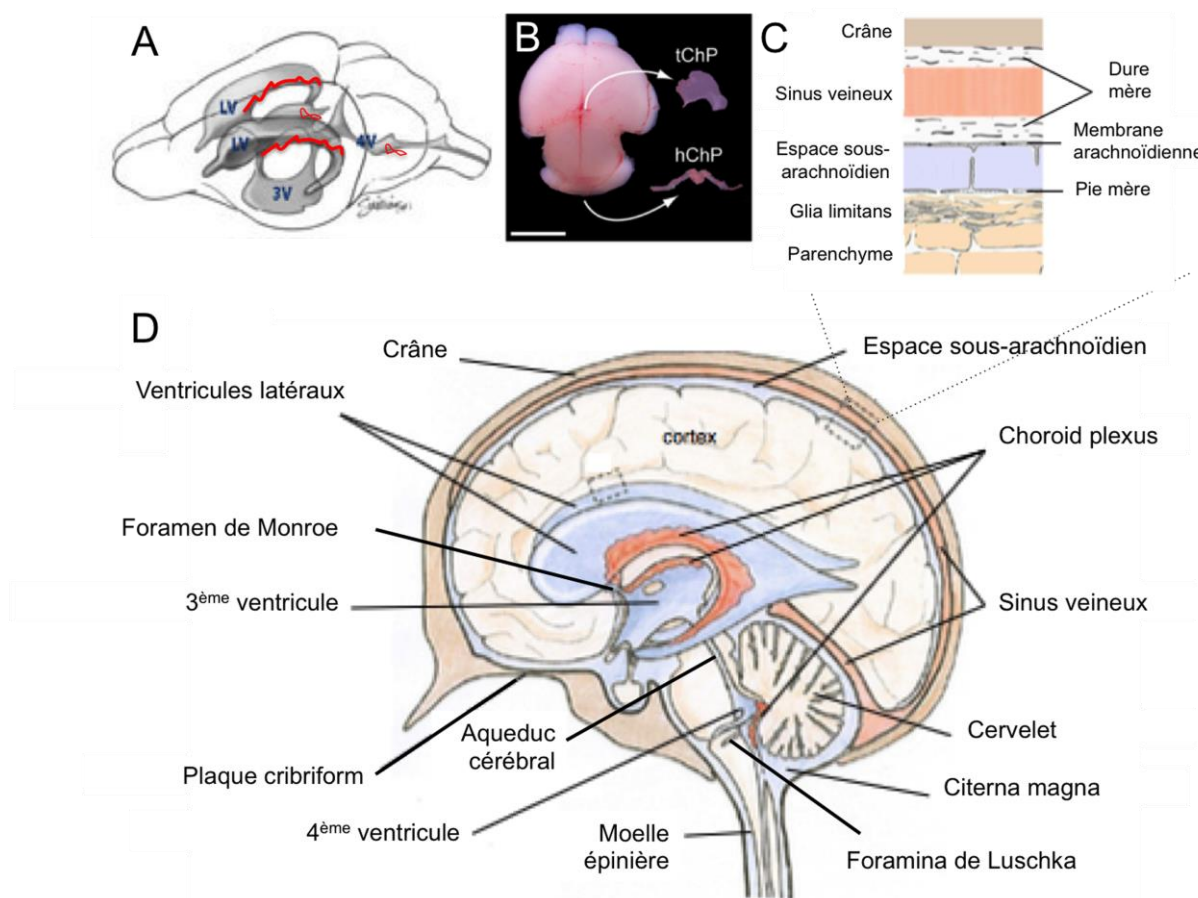
**Figure 1 : Développement du système nerveux, des ventricules et des PC au cours de l'évolution**

Ce schéma illustre le système nerveux de différentes espèces. Les étoiles de mer possèdent un système nerveux équivalent à la plaque neurale des vertébrés à un stade précoce, avant la formation du tube neural (1). Les neurones de l'étoile de mer sont en contact avec l'eau de mer, ce qui lui permet de détecter la composition de l'eau et d'adapter son comportement. Les entéropeustes sont une classe de vers marins de la famille des hémichordés qui présentent un tube neural ouvert (2) et semblable au tube neural des vertébrés avant la fermeture du neuropore. Les larves d'urochordées et des céphalocordés possèdent également un tube neural qui reste ouvert au niveau du neuropore antérieur chez la larve (3). Ainsi les neurones sont en contact avec l'eau de mer. Lorsque l'animal devient adulte, le neuropore se ferme et le tube neural forme une cavité (4). L'eau de mer est emprisonnée et constitue la première forme de LCS. Cette fermeture entraîne un changement profond pour la signalisation qui ne dépend plus de l'environnement extérieur, mais de l'activité et des métabolites de l'organisme. Chez les vertébrés (5), le tube neural se ferme durant le développement embryonnaire et la cavité résultante formera notamment les ventricules cérébraux. Les PC se développent et participent à la composition du LCS qui module l'activité du cerveau. Illustration adaptée à partir de Bueno *et al.* (2014) et Bueno & Garcia-Fernández (2016).

## **I- 1. Le système ventriculaire communique avec l'espace sous-arachnoïdien et contient les plexus choroïdes**

### ***I- 1.a Anatomie du système ventriculaire et localisation des plexus choroïdes***

Chez les mammifères, le système ventriculaire est composé de quatre ventricules cérébraux. Les deux ventricules latéraux sont situés dans chacun des hémisphères cérébraux. Ils sont reliés au 3<sup>e</sup> ventricule, situé entre les hippocampes au niveau dorsal, par le foramen de Monroe. Le 3<sup>e</sup> ventricule relie le 4<sup>e</sup> ventricule, positionné sous le cervelet, par l'aqueduc cérébral (Figure 2D). Chaque ventricule contient un PC (Figure 2A, B, D). Dans chacun des ventricules latéraux, un PC est présent sous la forme d'un fin feuillet plat coincé entre l'hippocampe et le mur ventriculaire latéral, et attaché à sa base dans une longue fente s'étendant depuis le foramen de Monroe (antérieur) jusque derrière l'uncus (postérieur). Le PC du 3<sup>e</sup> ventricule est continu avec les PC des ventricules latéraux par le foramen de Monroe bien que d'origine embryonnaire différente. Il s'attache en haut du 3<sup>e</sup> ventricule et forme de nombreux repliements dans la partie supérieure du 3<sup>e</sup> ventricule. Le PC du 4<sup>e</sup> ventricule est attaché derrière les pédoncules cérébelleux et s'étend de chaque côté du ventricule jusqu'aux foramina de Lushka et forme un V, de structure complexe, avec de nombreux lobules dans la partie supérieure du 4<sup>e</sup> ventricule. Le système ventriculaire prend ainsi fin avec le 4<sup>e</sup> ventricule et celui-ci est ensuite relié au canal central de la moelle épinière et à l'espace sous-arachnoïdien (Figure 2C). Les foramina de Lushka et le foramen de Magendie permettent de rejoindre l'espace sous-arachnoïdien (Figure 2D) (Lun, Monuki *et al.* 2015; Mortazavi *et al.* 2014; Wolburg & Paulus 2010; Boon *et al.* 2005).



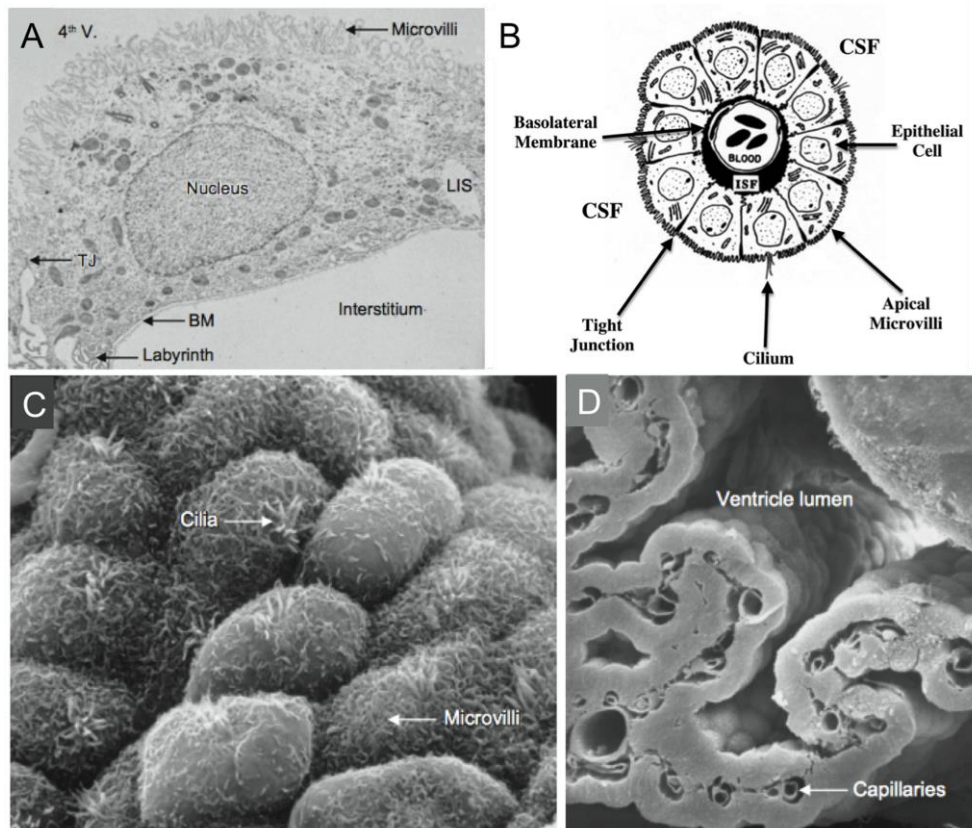
### Figure 2 : Localisation des PC dans les ventricules cérébraux

(A) Schéma des ventricules cérébraux de souris. La localisation des PC est indiquée en rouge. (B) Cette dissection des PC de souris (stade embryonnaire) permet d'apprécier la morphologie d'un PC d'un ventricule latéral (en haut) et du PC du 4<sup>e</sup> ventricule. Barre d'échelle 2mm. (C) Schéma de l'organisation des méninges. Le cerveau est protégé par le crâne auquel est fusionnée la dure-mère qui contient des sinus veineux. En dessous, la membrane arachnoïdienne forme la première limite de l'espace sous-arachnoïdien qui contient des vaisseaux sanguins. La pie-mère forme la seconde barrière de cet espace et protège le cerveau en formant une fine membrane à sa surface. En dessous, des pieds astrocytaires forment la glia limitans. (D) Schéma du cerveau humain présentant le système ventriculaire et ses composantes associées comme les foramina qui connectent les ventricules à l'espace sous-arachnoïdien. Illustrations adaptées à partir de jax.org (A), Lun *et al.* (2015) (B), Hladky & Barrand (2014) (C et D).



### ***I- 1.b Structure des plexus choroïdes***

Les PC forment une extension de la pie-mère. Cette couche fine et transparente des méninges enveloppe l'ensemble du cerveau et est séparée de l'arachnoïde par l'espace sous-arachnoïdien (Figure 2C). Les PC se développent à partir du tube neural. Celui-ci s'amincit, entraînant l'accolement de la pie-mère et de l'épithélium neural qui donnera les cellules épendymaires et les PC. Ainsi, les PC sont en continuité avec les cellules épendymaires chez l'adulte. Les PC sont constitués d'une couche de cellules épithéliales cubiques, de tissu conjonctif et de vaisseaux sanguins (Figure 3B, D). Les capillaires sanguins sont fenestrés, permettant la diffusion des molécules et de l'eau dans le tissu conjonctif. Les cellules épithéliales entourent le tissu conjonctif, composé de fibrilles de collagène, qui contient des péricytes, des macrophages, un réseau de capillaires sanguins et des fibres nerveuses. Les cellules épithéliales reposent sur une membrane basale et forment des villosités à la surface apicale (Figure 3A, D). Ces cellules possèdent également des microvillosités et des cils, qui pourraient participer au flux du LCS (Figure 3C). Des jonctions serrées et des desmosomes situés sur les membranes latérales des cellules épithéliales permettent de maintenir les cellules ensemble (Figure 3A). De plus, ces jonctions serrées empêchent la diffusion des molécules directement depuis le sang dans le cerveau, et forment une barrière nommée barrière hémato-LCS. Les cellules épithéliales contrôlent le transfert de ces molécules qui entrent dans la composition du LCS. Ainsi, les cellules épithéliales ont une polarité apico-basale prononcée, essentielle pour la localisation de transporteurs qui se trouvent spécifiquement sur l'une ou l'autre des membranes. Les PC ont un métabolisme très actif, de par leurs fonctions de sécrétion du LCS, et le flux sanguin dans les PC est cinq fois plus important que dans le reste du cerveau. Ce besoin énergétique est également souligné par la présence de nombreuses mitochondries (Lun, Monuki *et al.* 2015; Kaur *et al.* 2016; Mortazavi *et al.* 2014; Damkier *et al.* 2013).



### Figure 3 : Structure des PC

(A) Grâce à la microscopie électronique à transmission sur des PC de rat, on peut voir qu'une cellule épithéliale repose sur une lame basale (BM). Celle-ci sépare l'épithélium du tissu conjonctif (qui est absent sur cette image). Cette cellule possède des microvillosités du côté apical, en haut de l'image, et des jonctions serrées (TJ) la liant à la cellule adjacente. 4th V., 4th ventricule ; BM, Basal Membrane ; LIS, Lateral Intercellular Space ; TJ, Tight Junction. (B) Schéma des compartiments des PC. Les vaisseaux sanguins sont situés au centre (20% du volume du tissu), recouvert du tissu conjonctif (15% du volume), le tout entouré de cellules épithéliales (65% du volume). (C) Cette image de microscopie électronique à balayage sur des PC humains montre la surface des cellules épithéliales recouvertes de microvillosités et présentant des cils. (D) La cryofacturation sur un PC d'un ventricule latéral de souris montre l'organisation d'un PC avec de nombreux capillaires recouverts d'une couche de cellules épithéliales formant des replis dans les ventricules cérébraux. Illustrations de Damkier *et al.* (2013) (A, C, D) Johanson *et al.* (2011) (B).

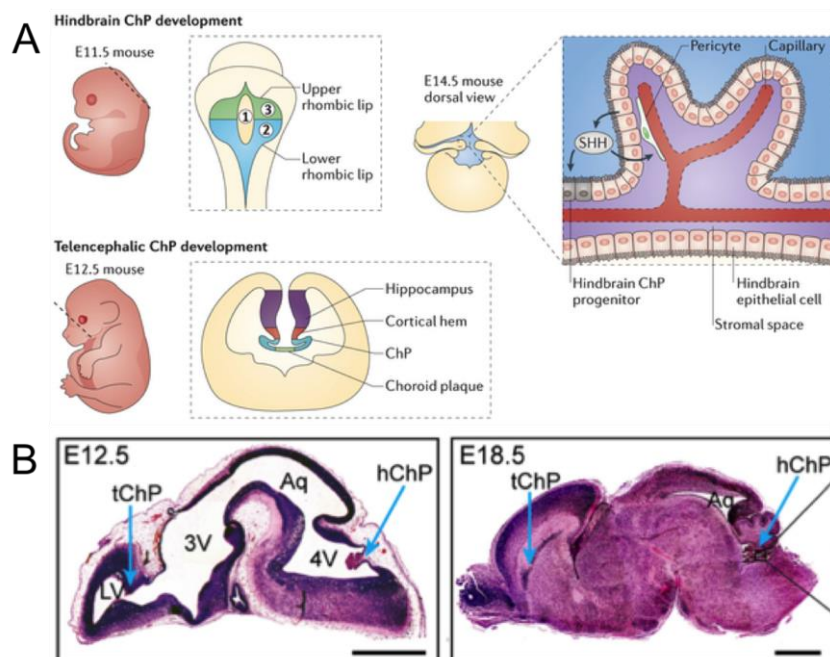
### ***I- 1.c Développement des plexus choroïdes***

#### **Région d'origine des plexus choroïdes**

Les PC se développent depuis la partie dorsale du tube neural. Après la fermeture de celui-ci commence le développement du PC du 4<sup>e</sup> ventricule dans le cerveau postérieur (dès E9.5 chez la souris) (Figure 4). Commence ensuite la formation de chacun des PC des ventricules latéraux (télencéphale, E12.5), qui se développent en même temps, suivi du PC du 3<sup>e</sup> ventricule (diencéphale, E14.5) (Figure 4) (Swetloff & Ferretti 2005). Durant le développement de ce dernier PC a lieu une fusion avec les PC des ventricules latéraux, après qu'une portion est passée par le foramen de Monroe. La formation et la maturation des PC suivent un processus commun en quatre stades (Annexe A) (Lun, Monuki, *et al.* 2015; Zappaterra & lehtinen 2012).

Les PC du 4<sup>e</sup> ventricule se développent en formant deux crêtes situées de part et d'autre de la partie dorsale du tube neural du cerveau postérieur. Ces crêtes se rejoindront par la suite pour ne former qu'un PC. Les PC des ventricules latéraux se développent dans la partie médiane qui relie les cavités du télencéphale dorsal à partir de la plaque choroïde (Figure 4A). Les cellules progénitrices se divisent à la base de cette plaque, puis s'ajoutent aux PC qui s'étendent ainsi dans les ventricules (Huang *et al.* 2009).

Les cellules épithéliales sont dérivées de l'épithélium neural et spécifiées par répression des gènes du développement proneural. Les cellules du tissu conjonctif sont dérivées du mésenchyme qui s'est invaginé dans le tube neural au niveau du site de formation des PC. Les progéniteurs qui donneront les cellules épithéliales des PC sont identifiables avant l'apparition des PC grâce à des marqueurs tels que la Tropomyosine et la Transthyretine (Nicholson-Flynn *et al.* 1996; von Frowein *et al.* 2006). Chez l'adulte, les PC sont stables et la prolifération est extrêmement faible (0,1% des cellules des PC par jour) (Liddelow 2015).



**Figure 4 : Formation et développement des PC**

(A) Schéma des zones de développement des PC chez la souris. Les encadrements correspondent aux lignes pointillées sur les schémas d'embryon de souris. A E9.5, le PC du 4<sup>e</sup> ventricule commence à se former à partir des lèvres rhombiques (schéma du haut, à gauche). A E12.5, les PC des ventricules latéraux se forment à partir de la plaque choroïde (schéma en bas). En haut à droite, le schéma illustre la sécrétion de Sonic Hedgehog (Shh) par les cellules épithéliales du 4<sup>e</sup> ventricule, ici à la fin de son développement à E14. Shh va intervenir dans le développement conjoint du tissu conjonctif et des cellules épithéliales. (B) Des marquages hématoxyline-éosine sur coupe sagittale permettent de visualiser, à E12.5, le début du développement des PC latéraux et le PC du 4<sup>e</sup> ventricule déjà développé. A E18.5, après la neurogenèse, les PC sont localisés dans les ventricules qui ont diminué de volume, envahi par le tissu neural. Barre d'échelle 2mm. Illustrations de Lun, Monuki *et al.* (2015) (A) et Lun, Johnson *et al.* (2015) (B).

### Développement synchronisé entre les cellules épithéliales et le tissu conjonctif

Les cellules épithéliales enveloppent le tissu conjonctif et ces deux composantes issues de feuilletts embryonnaires différents se développent en accord. Le développement des vaisseaux sanguins dans ce tissu en formation est notamment régulé par des facteurs sécrétés par les cellules épithéliales. En effet, dans le PC du 4<sup>e</sup> ventricule, Sonic Hedgehog (Shh) est exprimé par les cellules épithéliales et son récepteur est exprimé par les péricytes présents dans le tissu conjonctif (Figure 4A). Ceux-ci sont des cellules de support des vaisseaux sanguins, et sont capables d'instruire le développement des vaisseaux qui pourront agir en retour sur les cellules épithéliales (Nielsen & Dymecki 2010). De plus, la sécrétion de Shh promeut la prolifération des progéniteurs des cellules épithéliales (Huang *et al.* 2009).

## **I- 2. Le liquide cérebrospinal permet la communication entre le parenchyme et le système périphérique**

La sécrétion de LCS par les PC remplit de nombreuses fonctions qui seront décrites en Partie I- 3 (p. 25). Le LCS est renouvelé plusieurs fois par jour, ce qui nécessite donc à la fois la circulation de LCS et son élimination. L'injection de traceurs a été largement utilisée pour comprendre le processus de distribution et d'élimination des molécules dans le cerveau. Ceci a permis de mettre en évidence la communication entre les fluides du cerveau (Simon & Iliff 2016).

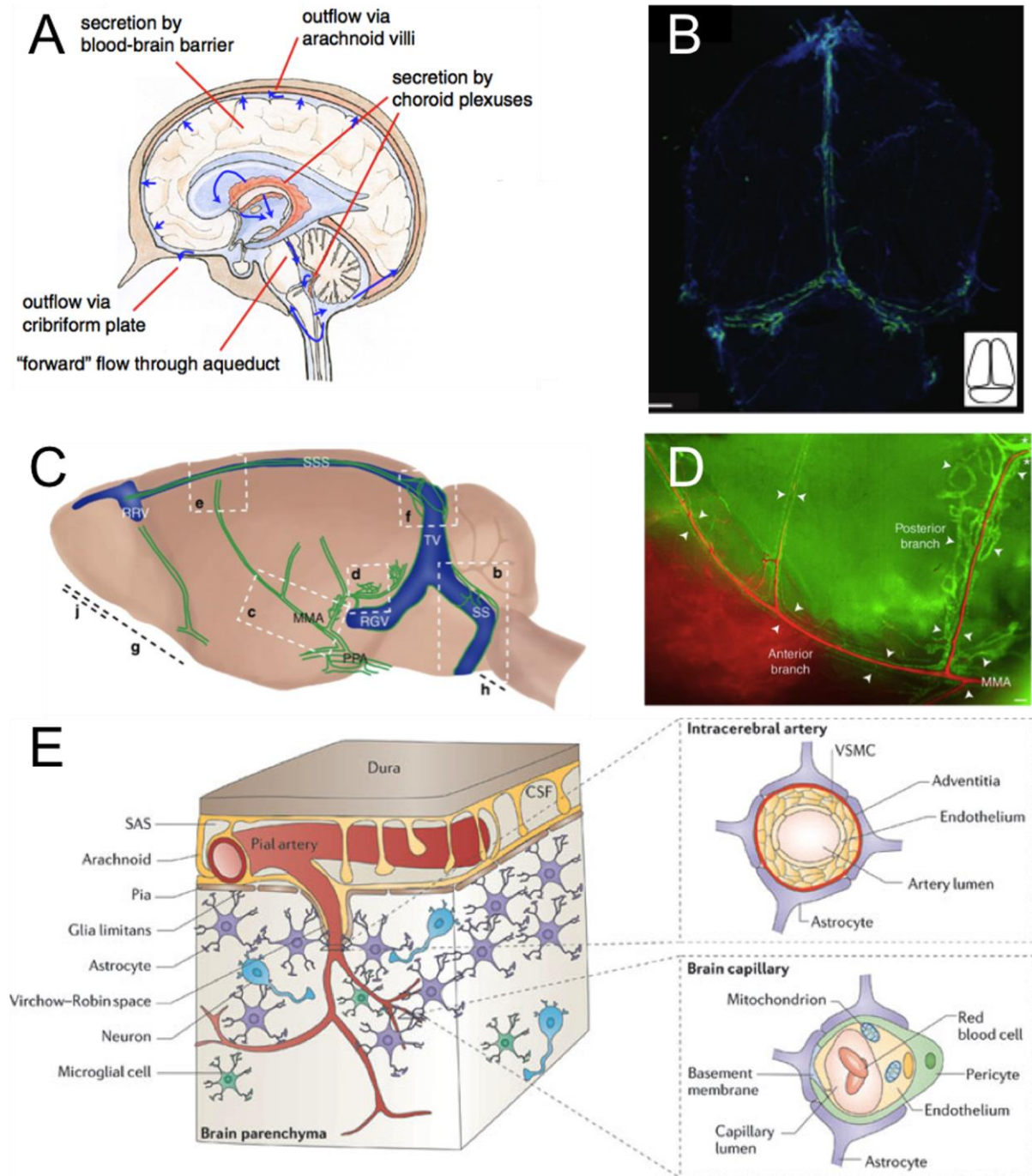
### ***I- 2.a Le liquide cérebrospinal est une interface entre les différents fluides du cerveau***

Le LCS est contenu dans le système ventriculaire, l'espace sous-arachnoïdien, entre la pie-mère et la glia limitans, et dans l'espace périvasculaire qui est une zone entre la pie-mère et le vaisseau sanguin pénétrant le parenchyme (Figure 5A, E) (Iliff *et al.* 2012; Hladky & Barrand 2014). Le LCS n'est pas le seul fluide du cerveau. Le sang permet d'apporter des molécules qui entreront dans la composition du LCS, via les PC ou les pieds astrocytaires. Ces pieds astrocytaires sont une composante de la barrière hémato-encéphalique qui permet de protéger le parenchyme du sang en contrôlant la diffusion des molécules et des cellules qu'il contient (Figure 5E). Le sang constitue aussi une composante du système d'élimination des déchets du parenchyme comme nous le verrons plus loin. Le troisième fluide est le liquide interstitiel. Il se situe entre les cellules dans le parenchyme et il baigne le cerveau. Enfin, le quatrième fluide du système nerveux central est la lymphe. Le système lymphatique a récemment été découvert et se situe le long des sinus veineux et des artères de la dure-mère (Figure 5B, C, D), en plus du système lymphatique de la muqueuse nasale sous la plaque cribiforme (Figure 7C) (Louveau, Smirnov, *et al.* 2015; Aspelund *et al.* 2015). Les vaisseaux lymphatiques sortent du cerveau en suivant les vaisseaux sanguins et rejoignent ensuite les nœuds lymphatiques cervicaux (Aspelund *et al.* 2015). Le système lymphatique participe donc à l'élimination des molécules du parenchyme cérébral. L'ensemble des fluides du système nerveux central va interagir

afin de maintenir l'homéostasie cérébrale (Brinker *et al.* 2014; Lun, Monuki, *et al.* 2015; Kaur *et al.* 2016; Simon & Iliff 2016; Bedussi *et al.* 2016).

### **Communication entre le liquide cébrospinal et le liquide interstitiel**

Le parenchyme du système nerveux central est baigné par le liquide interstitiel, qui peut notamment circuler le long des fibres de matière blanche et sous les cellules épendymaires, le long du mur ventriculaire. Les compositions du LCS et du liquide interstitiel diffèrent très légèrement, car il n'existe pas de barrière, telle que les barrières hémato-encéphalique ou hémato-LCS, entre ces deux fluides. Une première interface entre le LCS et le liquide interstitiel est formée par les cellules épendymaires qui possèdent des jonctions gap et sont donc perméables au LCS (Figure 6A). La seconde interface est composée par les espaces périvasculaires. Ces compartiments sont situés le long des vaisseaux sanguins qui pénètrent dans le parenchyme (Brinker *et al.* 2014). Au niveau de ces espaces, les artères emportent avec elles de la pie-mère — et donc du LCS de l'espace sous-arachnoïdien — qui les entoure. La pie-mère est alors en contact avec les pieds astrocytaires. Ce système « glymphatique » est donc composé des pieds astrocytaires de la glia limitans — en contact avec le liquide interstitiel — autour des espaces périvasculaires contenant du LCS (Figure 5E et 6B). L'injection de traceurs dans le LCS a permis de visualiser le flux de LCS dans l'espace périvasculaire et la communication, à ce niveau, entre le LCS et le liquide interstitiel (Iliff *et al.* 2012). Le traceur injecté est retrouvé après 10 minutes dans l'espace périvasculaire des artères, et après 30 minutes on observe la présence de marqueurs dans l'espace périvasculaire des veines. Ainsi, on peut postuler que les espaces périvasculaires autour des artères permettent l'entrée de LCS dans l'espace interstitiel, tandis que les espaces périvasculaires autour des veines permettraient au liquide interstitiel de rejoindre le LCS pour être ensuite éliminé (Figure 6C) (Bedussi *et al.* 2016; Simon & Iliff 2016; Iliff *et al.* 2012). Le liquide interstitiel est donc très proche de la composition du LCS, mais contient aussi des molécules qui sont transportées depuis les vaisseaux sanguins par la barrière hémato-encéphalique (Pardridge 1995; Pollay 2010). Le système nerveux central est donc en contact avec le LCS, ce qui permet la distribution de facteurs dans le parenchyme.

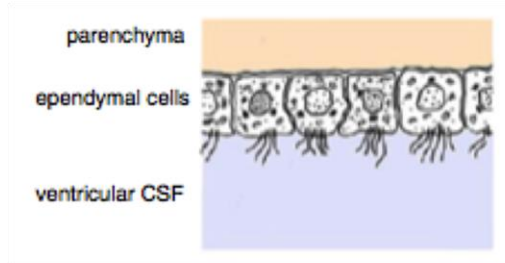


### Figure 5 : Les fluides du système nerveux central sont contenus dans des espaces restreints par des barrières cellulaires

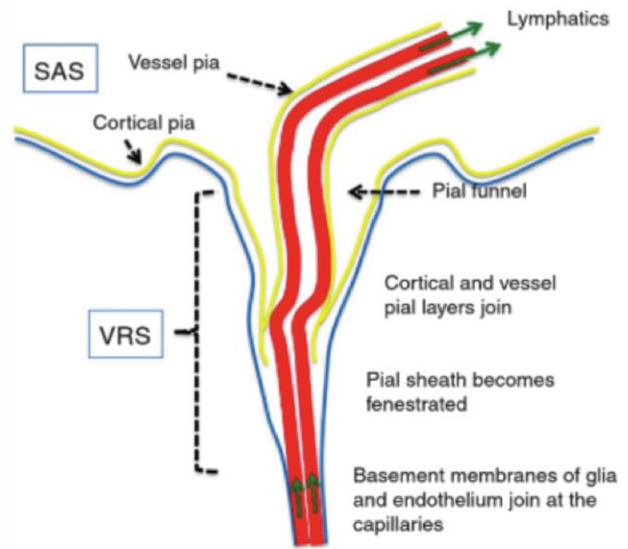
(A) Schéma de la localisation dans le cerveau du LCS (bleu) et du système sanguin (rouge), hors du parenchyme cérébral. Les flèches en bleu indiquent le mouvement du LCS. Le LCS est drainé depuis les ventricules latéraux vers le 3<sup>e</sup> ventricule par le foramen de Monroe, puis il traverse l'aqueduc cérébral jusqu'au 4<sup>e</sup> ventricule. Il descend ensuite le canal central dans la moelle épinière, ou rejoint l'espace sous-arachnoïdien par les foramina pour être réabsorbé (outflow). Le LCS circule également : le long des vaisseaux sanguins de l'espace sous-arachnoïdien, dans l'espace périvasculaire, et entre la pie-mère et la glia limitans. La plaque cribiforme est située sous les bulbes olfactifs, en bas à gauche de l'image. (B) Sur ce montage des méninges, en vue dorsale, on peut voir le système lymphatique (vert) associé au sinus veineux de la dure mère. Barre d'échelle 1mm. (C) Schéma des régions analysées chez la souris par Aspelund *et al.* (2015) avec les vaisseaux lymphatiques (vert) et le système veineux (bleu). La plaque cribiforme se trouve au niveau de la zone j (en bas à gauche). MMA, Middle Meningeal Artery ; PPA, PterygoPalatine Artery ; RGV, RetroGlenoid Vein ; RRV, Rostral Rhinal Vein ; SS, Sigmoid Sinus ; SSS, Superior Sagittal Sinus ; TV, Transverse Vein. (D) Les vaisseaux lymphatiques (vert) sont observés le long de certaines veines et artères de la dure-mère (rouge). Cette image provient de la zone c de la figure (C). Barre d'échelle 100 µm. (E) Sur ce schéma sont représentés les différents fluides présents au niveau de la surface du cerveau (méninges et surface du parenchyme) et les barrières entre ces fluides. Le liquide interstitiel du parenchyme est séparé du LCS de l'espace sous-arachnoïdien par la glia limitans et la pie-mère. Les vaisseaux sanguins de l'espace sous-arachnoïdien parcourent la surface du cerveau et sont entourés par la pie-mère. Ils pénètrent dans le parenchyme et on observe alors un espace périvasculaire (Virchow-Robin space) qui est une interface entre le sang, le LCS et le liquide interstitiel. Plus profondément, les vaisseaux forment des capillaires et sont alors, en général, entourés de péricytes et de pieds astrocytaires qui forment la barrière hémato-encéphalique, protégeant le liquide interstitiel de l'entrée de molécules du sang. SAS, SubArachnoid Space ; VSMC, Vascular Smooth Muscle Cell. Illustrations de Hladky & Barrand (2014) Louveau, Smirnov *et al.* (2015) (B) Aspelund *et al.* (2015) (C, D) Zlokovic (2011) (E).



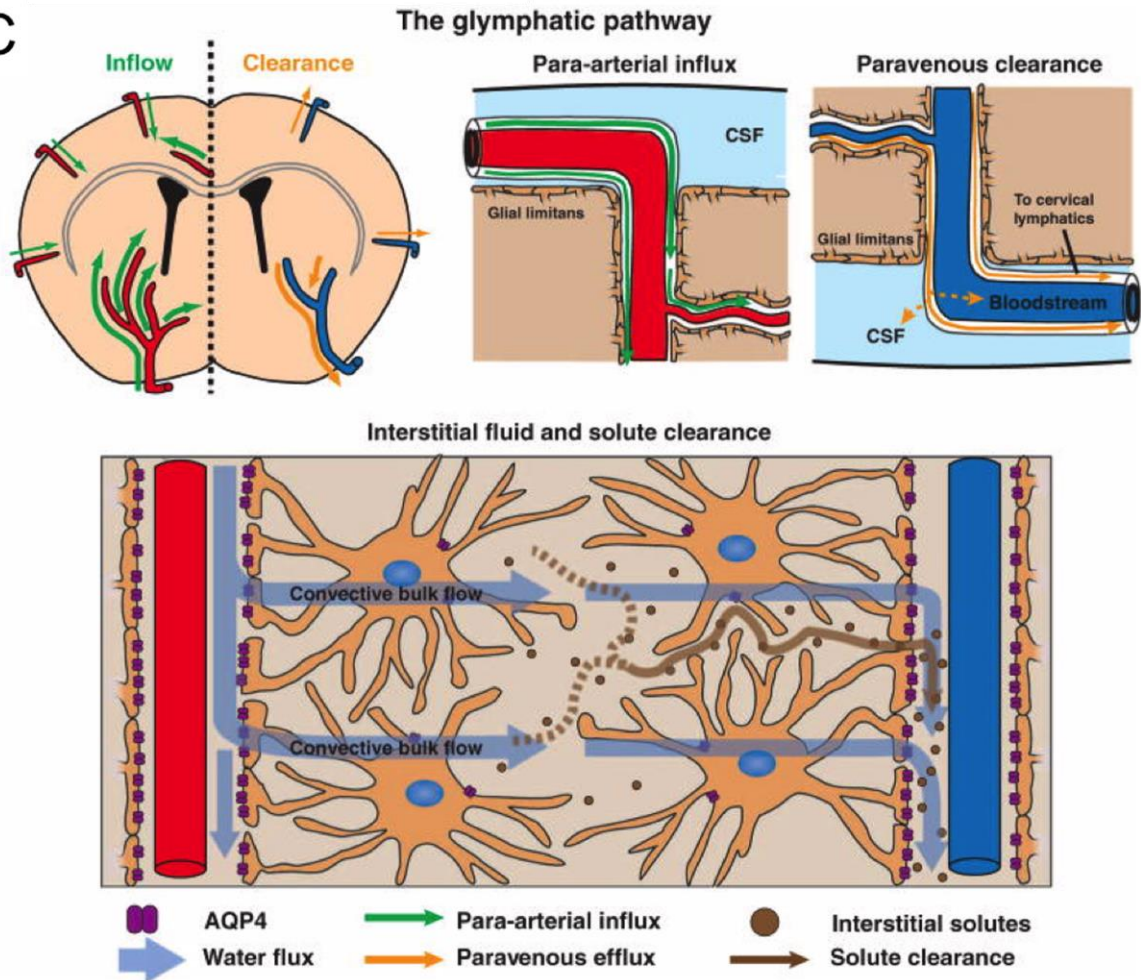
A



B



C



### Figure 6 : Espace de communication entre le liquide interstitiel et le LCS

(A) La première interface de communication se situe au niveau du mur ventriculaire composé de cellules épendymaires qui sont perméables. Ainsi, le liquide interstitiel du parenchyme communique avec le LCS contenu dans les ventricules cérébraux. (B) Sur ce schéma de l'espace périvasculaire (VRS) sont représentés la glia limitans (bleu), qui forme des pieds astrocytaires le long des vaisseaux (rouge) qui sont entourés de pie-mère (jaune). La pie-mère pourrait être fenestrée et perméable au LCS qui n'est alors séparé du liquide interstitiel que par les pieds astrocytaires (M. W. Zappaterra & lehtinen 2012; Simon & Iliff 2016; Louveau, Harris, *et al.* 2015; Mortazavi *et al.* 2014; Liddelow 2015). En dessous de l'espace périvasculaire, lorsqu'il n'y a plus de pie-mère, les pieds astrocytaires se forment directement sur les vaisseaux sanguins. (C) Le système glymphatique proposé par Iliff *et al.* (2012) serait composé d'un système d'entrée et de sortie du LCS polarisé avec l'entrée de LCS le long des artères cérébrales et une sortie du liquide interstitiel dans le LCS le long des espaces périvasculaires des veines. Les flux générés permettent d'éliminer les déchets générés par le parenchyme. Illustrations de Hladky & Barrand (2014) Brinker *et al.* (2014) (B) Iliff *et al.* (2012) (C).

### **Différents systèmes permettent la réabsorption du liquide cébrospinal**

Il existe différents mécanismes de réabsorption permettant au LCS de rejoindre la circulation sanguine ou le système lymphatique (Figure 7A, B). Le principal mécanisme de réabsorption implique des villosités (ou granulations) arachnoïdiennes (Figure 7C, D). Une fois que le LCS a rejoint l'espace sous-arachnoïdien, il est réabsorbé, via les villosités arachnoïdiennes, dans les sinus de la dure-mère. Un deuxième système de réabsorption se situe sous la plaque cribiforme et implique le système lymphatique (Figure 7C, E). La plaque cribiforme est perforée, permettant notamment le passage des nerfs olfactifs, et laisse passer le LCS. Celui-ci rejoint alors le système lymphatique présent dans la muqueuse nasale (Lun, Monuki, *et al.* 2015; Pollay 2010). Enfin, il a été mis en évidence que le système lymphatique associé au sinus veineux de la dure-mère permet également la réabsorption du LCS. Des molécules fluorescentes injectées dans le parenchyme sont en effet retrouvées dans ces vaisseaux lymphatiques qui rejoignent ensuite les nœuds lymphatiques cervicaux profonds (Figure 7B) (Aspelund *et al.* 2015).

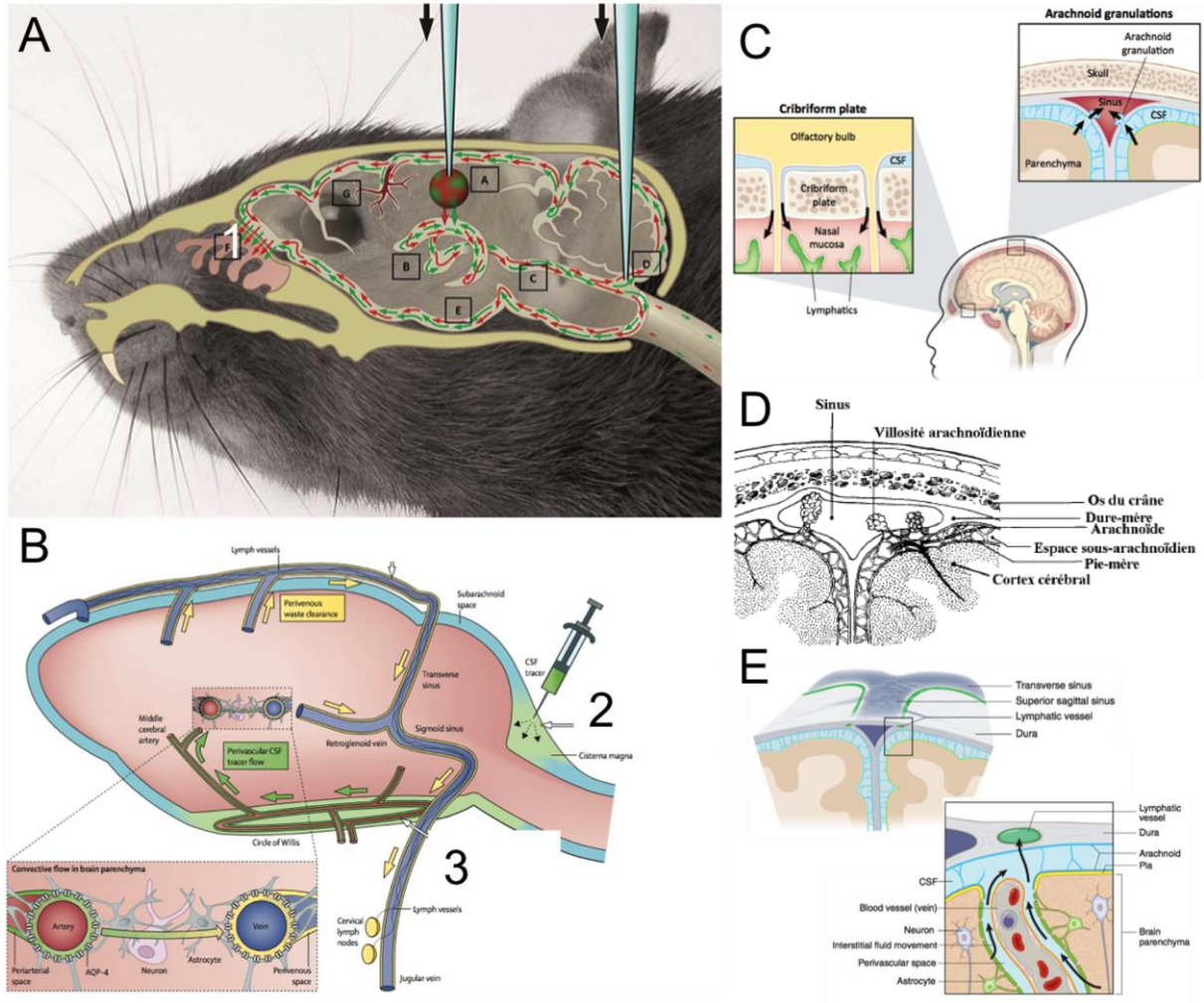
En résumé, ces systèmes vont permettre l'élimination de macromolécules rejetées par les cellules du parenchyme cérébral. Avant de rejoindre ces systèmes d'élimination, ces macromolécules seront rejetées par les cellules dans le liquide interstitiel. Il faudra ensuite qu'elles rejoignent le LCS pour être ensuite acheminées vers le sang ou la lymphe. Les PC peuvent également participer de manière mineure à la réabsorption du LCS (Simon & Iliff 2016; Bedussi *et al.* 2016).

### **Génération des flux du liquide cébrospinal et des échanges avec le liquide interstitiel**

Le mouvement du LCS et sa réabsorption sont régis par la respiration et les pulsations artérielles (Dreha-Kulaczewski *et al.* 2015; Iliff *et al.* 2013; Fame *et al.* 2016). Ces forces permettent le mouvement en flux du LCS plutôt qu'une simple diffusion. En effet, des traceurs de 0,9 et de 69 kDa, injectés dans le parenchyme de rat, sont éliminés à la même vitesse, ce qui soutient l'hypothèse d'un flux de liquide interstitiel et de LCS (Simon & Iliff 2016). Il semblerait que ces flux ne soient pas unidirectionnels, mais varient au rythme du cycle cardiaque dans un mouvement de va-et-vient, permettant le transfert des molécules du LCS dans tout le cerveau (Darko Orešković 2014).

Les plexus choroïdes sont des sources de facteurs régulant l'homéostasie cérébrale

On notera que dans les ventricules, le mur est formé par des cellules épendymaires. Celles-ci possèdent des cils qui pourraient permettre la formation de gradients de molécules dans le LCS (Sawamoto *et al.* 2006). Ainsi, la respiration et les pulsations jouent un rôle de moteur dans les mouvements de LCS, tandis que les cils pourraient être impliqués dans la formation d'un flux directionnel.



### Figure 7 : Les systèmes d'élimination du LCS et leur mise en évidence

(A-B) Schémas des deux différentes stratégies pour l'étude des flux de LCS et du liquide interstitiel. (A) La première stratégie consiste à injecter des marqueurs fluorescents de différentes tailles dans le parenchyme, ici le striatum, afin de visualiser leur mouvement dans le parenchyme par le liquide interstitiel. Cette stratégie a permis de mettre en évidence l'élimination de composés extracellulaires qui se retrouvent alors dans le LCS au niveau de l'espace sous-arachnoïdien et dans les ventricules cérébraux. Les flux dans l'espace sous-arachnoïdien vont entraîner les molécules dans les divers systèmes d'élimination, dont la plaque cribiforme localisée en 1. (B) La seconde stratégie est l'injection de marqueurs fluorescents de différentes tailles dans les citernes contenant du LCS, indiqué en 2. Le volume de la citerne magna, localisée sous le cervelet, est suffisamment important pour injecter le marqueur dans le LCS uniquement. Cette technique a mis en évidence le mouvement de LCS dans l'espace sous-arachnoïdien, l'entrée de molécules contenues dans le LCS dans le parenchyme via les espaces périvasculaires (flèche verte), et enfin la communication entre le LCS et le système lymphatique qui va permettre l'élimination des molécules dans les nœuds lymphatiques (flèche jaune). L'encart en bas à gauche présente de nouveau l'hypothèse de l'entrée des molécules du LCS par les espaces périvasculaires des artères et l'élimination par les espaces périvasculaires des veines. Les pulsations artérielles sont impliquées dans le mouvement du LCS. Le cercle de Willis à la base du crâne, en 3, est une anastomose d'artères qui pourrait donc participer au mouvement du LCS. (C) Cette illustration présente les deux premiers mécanismes identifiés pour l'élimination de LCS. On observe, à gauche, les perforations de la plaque cribiforme qui permettent au LCS de rejoindre le système lymphatique dans la muqueuse nasale. Un autre système implique les villosités arachnoïdiennes permettant au LCS de rejoindre le sang. (D) Ce schéma montre la structure des villosités arachnoïdiennes. L'espace sous-arachnoïdien pénétrant la dure-mère est entouré par les cellules endothéliales des veines et les tissus de la dure-mère. Un système semblable à des valves permet le mouvement unidirectionnel du LCS vers les sinus veineux. (E) Le dernier mécanisme identifié permet au LCS de rejoindre le système lymphatique situé dans la dure-mère. Les molécules du liquide interstitiel transfèrent donc par le système glymphatique pour rejoindre le LCS qui pourra être réabsorbé dans le système lymphatique. Illustrations de Bedussi *et al.* (2015) (A), Iliff *et al.* (2015) (B) Louveau, Harris *et al.* (2015) (C), afphb.be (D), Louveau, Smirnov *et al.* (2015) (E).

## ***I- 2.b Sources et composition du liquide cébrospinal***

### **Molécules contenues dans le liquide cébrospinal**

Le LCS contient principalement de l'eau (99%), mais aussi une grande diversité de molécules qui pourront participer à la signalisation : des ions, des protéines, des ARN non codants, dont des microARN (miARN), des lipides, du cholestérol, des hormones, du glucose et des glycosaminoglycanes (GAG). Ces molécules peuvent être sécrétées directement dans le LCS, transportées par des partenaires, ou encore encapsulées dans des exosomes (Lun, Monuki, *et al.* 2015).

Les fonctions des protéines sécrétées dans le LCS par les PC sont très diverses. Parmi les protéines sécrétées par des cultures de cellules épithéliales, ont été identifiées des protéines de la matrice extracellulaire (MEC), des facteurs de croissance, des transporteurs d'ions, des transporteurs d'hormones, comme la Transthyréline, des transporteurs de protéines, ou encore des enzymes (Thouvenot *et al.* 2006).

### **Les plexus choroïdes sont la source principale du liquide cébrospinal**

Les PC sécrètent 80% du LCS. Le reste du LCS provient du sang, après passage de la barrière hémato-encéphalique, et des cellules du parenchyme. Bien que la composition du LCS soit différente de celle du plasma, des molécules peuvent transférer (De Rougemont *et al.* 1960; Wright 1978; Hladky & Barrand 2014). Par exemple, du FGF-FITC injecté en intraveineux est retrouvé dans le LCS d'embryon de poulet (Martín *et al.* 2006). Les cellules du parenchyme sécrètent aussi des protéines et molécules qui vont ainsi entrer dans la composition du liquide interstitiel puis du LCS pour être éliminées ou participer à la signalisation. La glande pinéale sécrète également des protéines dans le LCS, notamment pour la régulation du rythme circadien (Tricoire *et al.* 2002).

### **Mise en place de la composition du liquide cébrospinal adulte**

Bien que majoritairement formé par les PC, il est important de préciser que le LCS embryonnaire est un cas particulier. En effet, le LCS présent juste après la fermeture du tube neural est composé de liquide amniotique emprisonné à ce moment (E8.5). Ce LCS évolue rapidement et soutient d'importantes fonctions dans

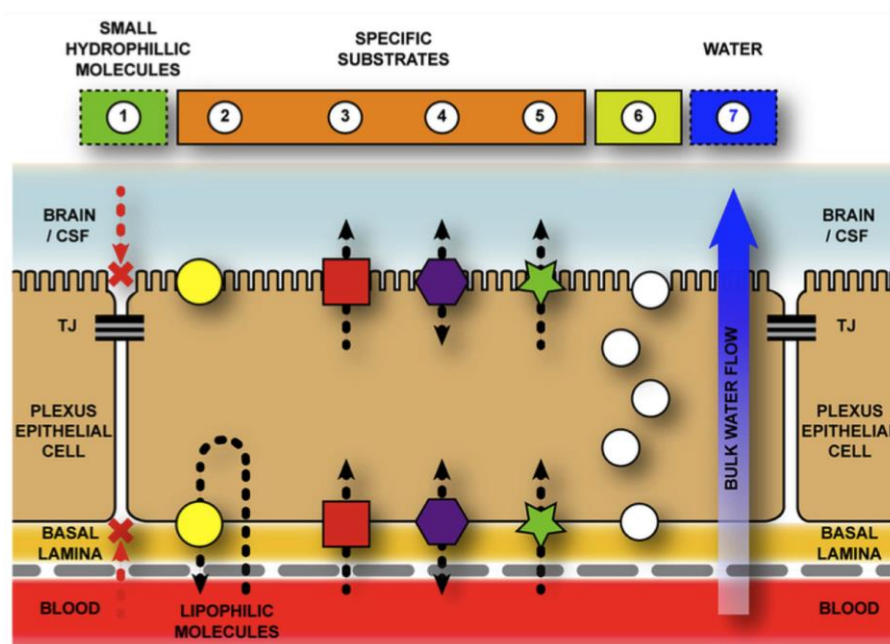
le développement du système nerveux central telles que la prolifération des précurseurs neuronaux (lehtinen *et al.* 2011). Dès la formation des PC, ceux-ci vont modifier la composition du LCS en sécrétant divers facteurs (Bueno & Garcia-Fernández 2016). Sa composition évolue tout au long de la vie et notamment la quantité totale et la proportion des différents types de protéines. Au cours du développement embryonnaire, la quantité de protéines dans le LCS s'accroît et atteint son maximum à la naissance chez les rongeurs. Cette augmentation du taux de protéines pourrait s'expliquer par une augmentation de molécules produites par le parenchyme en croissance ou bien être un élément induisant son développement (Lun, Monuki, *et al.* 2015). De plus, la quantité importante de protéines du LCS embryonnaire permettrait de créer une pression osmotique soutenant le développement du tissu neural. Enfin, les compositions respectives du LCS embryonnaire et adulte semblent finement régulées afin de contrôler la neurogenèse (Parties I- 3.c et III- 5, p.27 et 110) (Lun, Monuki, *et al.* 2015; Bueno & Garcia-Fernández 2016).

### **L'épithélium des plexus choroïdes permet une sécrétion intense de liquide cébrospinal**

Les PC possèdent des transporteurs pour de nombreux types de molécules allant de l'eau aux protéines, en passant par les ions et les précurseurs métaboliques (Figure 8). Les transporteurs d'ions aux membranes basale et apicale permettent de maintenir un gradient de pression osmotique qui entraîne le passage des molécules d'eau depuis le sang dans le LCS, via l'aquaporine-1. Ces transporteurs sont nécessaires au transfert des molécules depuis le sang. Les jonctions serrées empêchent le passage des molécules, par exemple celui d'ions de 139 Da, et sont nécessaires pour la formation du gradient de pression osmotique (Mortazavi *et al.* 2014; Lun, Monuki, *et al.* 2015; Liddelow 2015).

Les PC sécrètent du LCS en permanence et de manière importante. La capacité de sécrétion évolue non seulement avec l'âge, mais également selon des cycles journaliers. Bien que les valeurs absolues soient sujettes à débat, le LCS, qui représente 40 µl, serait renouvelé 12 à 13 par jour chez la souris. Chez l'Homme, la capacité de sécrétion des PC a été estimée à 0,37 mL/min, ce qui équivaut à une production de 500 mL par jour alors que la quantité de LCS dans les ventricules est de 150 mL. Il y a donc un remplacement du LCS 3 à 4 fois par jour (Kaur *et al.* 2016; Simon & Iliff 2016; Mortazavi *et al.* 2014).





**Figure 8 : Les PC possèdent divers systèmes de transport**

Schéma des différents types de transporteurs que l'on peut trouver dans les PC afin de réguler le passage de molécules entre le sang et le LCS. Tout d'abord, les jonctions serrées des PC empêchent le passage de molécules entre le milieu interstitiel des PC et le LCS (1). Il existe alors différents transporteurs pour différentes fonctions. (2) Les transporteurs permettent d'éliminer spécifiquement des molécules cytoplasmiques ou du milieu extracellulaire, dans le sang. (3) D'autres transporteurs permettent le mouvement des ions et autres petites molécules, comme le glucose, depuis le sang vers les cellules épithéliales (transporteurs à la membrane basal), puis dans le LCS (transporteurs à la membrane apicale), tandis que certains transporteurs (4) permettent le mouvement des molécules dans les deux sens. (5) Pour les protéines, telles que l'albumine, il existe des transporteurs spécifiques qui permettent le transfert depuis le sang vers le LCS. (6) Il existe également un système de transport impliquant le système vésiculaire en conjonction des récepteurs permettant de transférer spécifiquement des molécules. (7) Enfin, le passage de l'eau depuis le sang vers le LCS se fait par l'aquaporine-1. Illustration de Liddelow (2015).

### **I- 3. Rôles des plexus choroïdes et du liquide cébrospinal**

Les PC ont une place majeure dans la régulation de l'homéostasie cérébrale de par leur organisation physique et leur capacité de sécrétion. En effet, les jonctions serrées au pôle apical des cellules épithéliales des PC permettent de former une barrière entre la circulation sanguine et le LCS. Ce rôle de barrière pourra être atteint en cas de pathologie. La sécrétion de LCS par les PC remplit divers rôles ; dont un effet purement mécanique en absorbant les chocs, un effet chimique en contrôlant le pH du cerveau, et des rôles de détoxification et de signalisation (Simon & Iliff 2016).

#### ***I- 3.a Les plexus choroïdes participent à la surveillance immunologique du système nerveux central***

Le système nerveux central a longtemps été considéré comme un organe privilégié immunitairement en condition physiologique, sans contact avec le système immunitaire périphérique et sans immunosurveillance. En effet, le parenchyme présente peu de cellules présentatrices d'antigènes et de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, impliquées dans les réactions immunitaires. Ainsi le système nerveux central ne serait pas capable d'instruire des réactions immunitaires. Bien que le système immunitaire observé dans les autres organes ne soit pas retrouvé dans le système nerveux central, de nombreuses études ont montré une communication entre le système immunitaire et le parenchyme, permettant un bon fonctionnement cérébral. En effet, des molécules du système nerveux central peuvent entraîner une réponse immunitaire dans les nœuds cervicaux lymphatiques. Or, ces derniers sont impliqués dans l'élimination du LCS suggérant que certaines molécules provenant du parenchyme vont être des antigènes permettant une réaction immunitaire. De plus, on observe des cellules présentatrices d'antigènes et des lymphocytes T dans le système lymphatique du système nerveux central (Louveau, Harris, *et al.* 2015).

Les PC et le LCS contiennent également de nombreuses cellules immunitaires telles que des lymphocytes T et B, des monocytes et des cellules dendritiques. Ces cellules immunitaires entrent facilement dans le tissu conjonctif grâce aux capillaires,

qui sont fenestrés dans les PC. En effet, des lymphocytes fluorescents injectés en intraveineuse sont retrouvés dans le tissu conjonctif des PC après 2 heures (Carrithers *et al.* 2002). Certaines cellules immunitaires peuvent même traverser les cellules épithéliales et rejoindre le LCS (Meeker *et al.* 2012). Les PC pourraient donc réguler l'état immunologique du système nerveux central. Ils peuvent également participer à la plasticité cérébrale, car les lymphocytes T ont été impliqués dans la régulation de la neurogenèse et de l'apprentissage spatial (Ziv *et al.* 2006) (Autre exemple en Partie II- 2.e, p.51). Trois catégories de macrophages ont été associées aux PC : les cellules épiplexus associés aux microvillosités des cellules épithéliales des PC ; les cellules supraépendymaires situées près des cellules épendymaires bordant le parenchyme cérébral ; les cellules flottant librement dans le LCS. Bien que leur rôle direct dans la surveillance immunologique du système nerveux central n'ait pas encore été prouvé, ces cellules expriment des molécules suggérant qu'elles sont impliquées dans l'endocytose et dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes. Les PC pourraient ainsi constituer un médiateur entre les systèmes immunitaires du système nerveux central et périphérique (Kaur *et al.* 2016; Lun, Monuki, *et al.* 2015; Mortazavi *et al.* 2014).

### ***I- 3.b Le liquide cébrospinal permet de détoxifier le cerveau***

#### **Circuit du liquide cébrospinal**

La production continue de LCS et le système de réabsorption permettent un renouvellement permanent du LCS, qui accumule les produits du métabolisme des cellules du système nerveux central et de l'activité synaptique (Kaur *et al.* 2016; Emerich *et al.* 2005). L'étude de Bedussi *et al.* (2016) a notamment permis de montrer un flux de liquide interstitiel depuis le striatum vers les ventricules, ce qui permettrait de concentrer les métabolites dans le LCS. Des traceurs fluorescents de 3 et 500 kDa sont alors retrouvés dans l'espace sous-arachnoïdien, montrant que le processus d'élimination fonctionne pour de nombreuses molécules.

#### **Réabsorption de liquide cébrospinal par les plexus choroïdes**

Les PC participent également à la détoxification du système nerveux central, soit par leur capacité de réabsorption, soit par leurs multiples systèmes de détoxification (Emerich *et al.* 2005). Les cellules épithéliales des PC sont en effet

capables d'absorber directement ou par pinocytose (endocytose non spécifique de fluide extracellulaire et des molécules présentes dans celui-ci) les molécules présentes dans le LCS. Ces molécules sont ensuite dégradées dans la cellule ou rejetées dans le tissu conjonctif. Les PC expriment également de nombreuses molécules et protéines permettant de neutraliser des composés toxiques et les radicaux libres présents dans le LCS, protégeant ainsi le système nerveux central des toxines et du stress oxydatif (Mortazavi *et al.* 2014).

En plus de ce rôle de détoxification, la capacité des PC à internaliser des molécules présentes dans le LCS permettrait une signalisation du parenchyme vers les PC pour moduler leur activité sécrétoire.

### **Détoxification et sommeil**

Une étude combinant l'injection de traceurs et l'imagerie deux-photons sur des souris éveillées, endormies ou anesthésiées a évaluée que 40 à 80% des métabolites présents dans l'espace extracellulaire du cortex cérébral superficiel étaient évacués durant le sommeil. Le système glymphatique permettrait des échanges et des mouvements de liquide interstitiel et de LCS plus importants durant le sommeil. De plus, l'espace extracellulaire augmente de 60% durant le sommeil. Les mouvements de liquide interstitiel accentués par le battement artériel permettent alors d'éliminer les métabolites qui rejoignent le LCS puis les systèmes d'élimination (Xie *et al.* 2013).

Une étude a montré que, chez l'Homme, la production de LCS est plus importante à 2 h qu'à 18 h (Mortazavi *et al.* 2014), ce qui suggère que la capacité de sécrétion des PC augmente pendant la nuit pour une meilleure élimination des métabolites.

### ***I- 3.c Le liquide cébrospinal permet de transporter des facteurs de signalisation***

Si le LCS draine les métabolites du système nerveux central, il contient également de nombreuses molécules nécessaires à la signalisation et donc à l'homéostasie cérébrale. Ainsi, les fonctions de signalisation du LCS, qui peut atteindre, a priori, toutes les régions du système nerveux central, sont multiples. Les conséquences d'un défaut dans le système de sécrétion par les PC sont donc variées, allant d'un défaut de signalisation dans une cellule cible jusqu'à un changement de

comportement de l'individu. En effet, chez des souris mutantes pour un transporteur au potassium présentant un haut niveau de stress et des crises d'épilepsie, une supplémentation en myo-inositol, un précurseur métabolique, dans le LCS, permet de rétablir le phénotype comportemental (Lun, Monuki, *et al.* 2015). Le LCS est également important pour la régulation du sommeil et de l'appétit (Zappaterra & lehtinen 2012).

### **Un seul liquide cébrospinal pour différentes signalisations**

Les messagers contenus dans le LCS peuvent atteindre toutes les structures du système nerveux central, mais il existe une spécificité cellulaire pour chacun de ces signaux. La capacité de signalisation du LCS dépend donc des cellules cibles qui ne répondront pas toutes aux mêmes signaux, un des systèmes les plus évidents pour le ciblage de la signalisation étant les récepteurs présents à la membrane des cellules cibles. Le transfert des molécules peut également impliquer la MEC afin de reconnaître et capturer spécifiquement des facteurs dans un sous-type cellulaire (Lun, Johnson, *et al.* 2015; Beurdeley *et al.* 2012; Kerever *et al.* 2007).

### **Les différents plexus choroïdes contribuent de manières distinctes à la composition du liquide cébrospinal**

Bien que les LCS produits par les différents PC se retrouvent dans le même compartiment, à savoir le système ventriculaire, une étude avait déjà montré en 1983 que les LCS contenus dans les ventricules latéraux étaient différents de celui contenu dans le 4<sup>e</sup> ventricule (Cavanagh *et al.* 1983). Plus récemment, il a été montré que les PC des ventricules latéraux et le PC du 4<sup>e</sup> ventricule n'expriment pas les mêmes protéines durant le développement embryonnaire (Lun, Monuki, *et al.* 2015; Huang *et al.* 2009). De plus, des facteurs importants pour le développement des PC peuvent agir de différentes manières selon le PC étudié. Enfin, dans un même PC, la sécrétion peut changer si l'on étudie la partie antérieure ou postérieure. Ainsi, la composition du LCS diffère entre les ventricules, et des gradients de distribution de facteurs seraient formés dans un même ventricule, ce qui pourrait avoir de nombreuses conséquences sur la signalisation dans les différentes aires du cerveau (Lun, Johnson, *et al.* 2015).

### **Le liquide cébrospinal est un régulateur de la neurogenèse embryonnaire**

Le LCS embryonnaire contient de nombreux facteurs de croissance, et les PC sont une source de signaux instruisant la neurogenèse embryonnaire. Les cellules de glie radiaires corticales contactent directement le LCS via un cil primaire qui possède des récepteurs permettant de transduire des signaux provenant du LCS. Les molécules du LCS peuvent ainsi moduler les propriétés des progéniteurs. Par exemple, l'IGF2 est sécrété par les PC dans le LCS, transduit par IGF1R dans les progéniteurs et constitue alors un signal promouvant la prolifération durant la neurogenèse tardive (lehtinen & Walsh 2011). L'expression par les PC de molécules de guidage telles que Slit2 permet par exemple, *in vitro*, de repousser les progéniteurs des neurones du cortex et les interneurons du bulbe olfactif (BO) (Hu 1999). Ainsi, la signalisation par le LCS est complexe, car tous ces signaux interagissent pour instruire un développement correct du cerveau.

Comme mentionné précédemment, la composition du LCS peut différer selon les ventricules dus aux sécrétions différentes des PC. Ainsi, la sécrétion de Shh par le PC du 4<sup>e</sup> ventricule, et nécessaire à son développement, est également un important régulateur de la prolifération des précurseurs des neurones du cervelet situés juste au-dessus du PC (Huang *et al.* 2010). On peut supposer que la différence de sécrétion entre les PC permet une signalisation spécifique pour les diverses aires du cerveau, en plus de la variété des récepteurs exprimés dans ces régions (Lun, Monuki, *et al.* 2015).

En plus de fournir des facteurs trophiques, le LCS est important pour la neurogenèse de par sa fonction mécanique. En effet, la pression hydrostatique doit être finement régulée : une pression trop élevée entraîne une hydrocéphalie et des défauts de prolifération cellulaire, tandis qu'une pression trop faible entraîne une diminution de la taille du cerveau (Zappaterra & lehtinen 2012; Bueno & Garcia-Fernandez 2016).

## **I- 4. Implications pathologiques et intérêts thérapeutiques**

En cas d'atteinte du système nerveux central, on peut observer une prolifération et maturation des lymphocytes T dans les nœuds lymphatiques, et la suppression de ces lymphocytes entraîne une diminution de la survie neuronale. Le système immunitaire est donc important pour le maintien du système nerveux central (Louveau, Harris, *et al.* 2015). Bien qu'ils constituent des protections pour le parenchyme cérébral, les PC, le LCS et les cellules immunitaires qu'ils contiennent peuvent également être impliqués dans le développement de maladies du système nerveux central). On observe en effet des défauts de sécrétion dans des cas de pathologie très divers (Kaur *et al.* 2016; Simon & Iliff 2016). Toutefois, il est difficile d'établir un lien causal entre le développement de maladies multifactorielles et ces altérations des PC et du LCS, qui peuvent aussi être une conséquence de ces pathologies. De plus, même si des défauts de ces systèmes ne sont liés qu'indirectement à une maladie du système nerveux central, la création d'un stress supplémentaire pourrait aggraver la pathologie ou résulter au développement d'une autre (Emerich *et al.* 2005). Les PC peuvent aussi être un site pathologique primaire puisqu'il existe des tumeurs des PC, principalement pédiatriques (Mortazavi *et al.* 2014).

### ***I- 4.a Pathologies impliquant les plexus choroïdes***

#### **Pathologies associées au liquide cébrospinal**

Les PC sont impliqués dans des pathologies impliquant le LCS, comme l'hydrocéphalie qui est un excès de LCS entraînant une distension des ventricules cérébraux (Kaur *et al.* 2016; Mortazavi *et al.* 2014). L'hydrocéphalie est le plus souvent due à un défaut de réabsorption ou à une obstruction empêchant le flux du LCS.

#### **Voie d'entrée des pathogènes**

Les PC peuvent jouer un rôle dans le développement de pathologies en étant une voie d'entrée dans le système nerveux central pour les différents pathogènes

(virus, bactéries, champignons et parasites). Ceci pourra notamment entraîner une inflammation et déboucher sur le développement de méningites ou d'encéphalites. Les pathogènes peuvent entrer dans le système nerveux central soit directement, en perturbant les jonctions serrées entre les cellules épithéliales, soit en infectant une cellule immunitaire qui transite entre ces cellules épithéliales. Un autre mécanisme développé par les pathogènes est le transfert à travers une cellule épithéliale pour rejoindre le LCS, soit librement, soit dans des neutrophiles qui transitent entre le tissu conjonctif et le LCS (Damkier *et al.* 2013; Schwerk *et al.* 2015; Kaur *et al.* 2016).

### **Rôle dans l'inflammation**

Par leur rôle d'interface entre le système immunitaire périphérique et le système nerveux central, les PC joueraient également un rôle important dans l'inflammation. L'inflammation est considérée comme un acteur important de la mort neuronale observée dans de nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives, les infections, les traumatismes, les ischémies, mais aussi la sclérose en plaques, qui est une maladie de nature inflammatoire (maladie auto-immune due à un défaut de contrôle du système immunitaire). Des cytokines sont alors produites et vont participer à la rupture de la barrière hémato-encéphalique et donc à l'entrée massive de lymphocytes dans le système nerveux central. Des défauts de la barrière hémato-LCS entraînant l'entrée de leucocytes dans le parenchyme ont été également mis en cause en conditions pathologiques. Les leucocytes peuvent alors passer par les cellules épithéliales, ou entre celles-ci, et rejoindre le LCS (Kaur *et al.* 2016).

### ***I- 4.b Les plexus choroïdes et les maladies du vieillissement***

Au cours du vieillissement, divers changements morphologiques et fonctionnels ont été rapportés. Au niveau morphologique, on observe un aplatissement des cellules épithéliales. Les membranes basales de ces cellules et des cellules endothéliales, ainsi que le tissu conjonctif, s'épaississent. Des inclusions intracellulaires lipidiques et protéiques se forment (Damkier *et al.* 2013). Au niveau fonctionnel, les PC subissent une augmentation du stress oxydatif et produisent moins de LCS, ce qui peut impacter l'approvisionnement de molécules importantes pour l'homéostasie du système nerveux central. L'élimination du LCS est également



ralentie, en partie due à une fibrose des méninges qui pourrait impacter l'efflux de LCS par les villosités arachnoïdiennes. Ainsi, cette diminution de production et d'élimination de LCS entraîne une diminution du taux de renouvellement de LCS, ce qui compromettrait l'élimination des composés toxiques (Kaur *et al.* 2016; Damkier *et al.* 2013). Le système glymphatique est notamment impliqué dans l'élimination de la protéine A $\beta$  (Ilyff *et al.* 2012). Ainsi, les dysfonctions des PC et du LCS pourraient participer au développement ou à l'aggravation de maladies telles que la maladie d'Alzheimer, en diminuant l'élimination des résidus amyloïdes et l'apport de facteurs trophiques (Kaur *et al.* 2016; Simon & Ilyff 2016).

#### ***I- 4.c Intérêts thérapeutiques des plexus choroïdes et du liquide cébrospinal***

Les propriétés des PC peuvent être exploitées dans un intérêt thérapeutique selon différentes approches. La propriété de barrière des PC peut être mise à profit pour développer des stratégies thérapeutiques en modulant sa perméabilité ou en utilisant les transporteurs pour laisser entrer dans le système nerveux central des molécules d'intérêts. Ainsi, il est déjà connu que certaines molécules peuvent diffuser à travers la barrière hémato-LCS mais pas par la barrière hémato-encéphalique. Le développement de molécules pharmaceutiques doit toutefois prendre en compte le rôle de détoxification des PC qui possèdent des transporteurs capables d'éliminer les substances exogènes (Emerich *et al.* 2005; Zappaterra & lehtinen 2012). A l'inverse, en cas d'inflammation, des stratégies thérapeutiques visant à maintenir l'intégrité des PC pourraient permettre de limiter l'entrée de leucocytes et de réduire l'inflammation (Kaur *et al.* 2016). Enfin, les PC peuvent être mis à profit en exploitant leur capacité de production de molécules dans le LCS. Ainsi, des stratégies de thérapie génique, afin de surexprimer ou d'éteindre l'expression de certaines molécules, pourraient permettre d'agir sur l'homéostasie cérébrale.

Des injections de cocktails de facteurs trophiques dans le LCS permettent de stimuler la prolifération et la migration de neurones dans les zones d'infarctus cérébral. Un autre moyen d'accès au système nerveux central est l'utilisation de la voie intranasale pour délivrer des molécules dans le LCS, puis dans le parenchyme via les espaces périvasculaires (Lochhead *et al.* 2014).

En plus de l'utilisation des PC et du LCS comme voie d'entrée dans le système nerveux central, des approches de greffes de PC dans le parenchyme ont été explorées, notamment dans la cadre de maladies neurodégénératives (Sandrof *et al.*

2016). Dans les cas d'ischémie cérébrale, l'implantation de PC dans la région de la lésion permet de diminuer la zone lésée et d'améliorer le fonctionnement cérébral (Borlongan *et al.* 2004). Les facteurs de croissance sécrétés par le PC greffé, tels que le BDNF, participent sûrement à l'amélioration observée. De plus, l'utilisation de PC modifiés génétiquement ouvre des perspectives intéressantes afin de surexprimer des molécules d'intérêts. Une molécule permettant d'améliorer davantage la récupération en cas d'infarctus pourra être surexprimée. On pourrait également faire une greffe de PC exprimant des facteurs trophiques afin de limiter la perte de neurones, ou améliorer des thérapies cellulaires dans le cadre des maladies neurodégénératives (Emerich *et al.* 2005; Zappaterra & lehtinen 2012).

## I- 5. Conclusion Partie 1

Les PC sont des organes dont les potentiels de régulation de l'homéostasie cérébrale sont vastes et toujours en cours d'exploration. Leur capacité à sécréter de nombreuses molécules diffusant dans le parenchyme en fait des acteurs majeurs de la signalisation du système nerveux central (Lun, Monuki, *et al.* 2015). De plus, leur rôle de barrière entre le sang et le LCS pourrait être impliqué dans la communication entre le système nerveux central et le système périphérique (Kaur *et al.* 2016).

Le LCS est le vecteur de la diffusion des molécules produites par les PC. Le LCS peut ainsi distribuer des facteurs de signalisation dans tout le parenchyme cérébral. Grâce à ses échanges avec le liquide interstitiel, il permet aussi d'éliminer les molécules toxiques (Simon & Iliff 2016; Iliff *et al.* 2012).

Les PC et le LCS constituent des interfaces entre le parenchyme cérébral et le système périphérique. Cette propriété pourra être mise à profit dans le cadre de recherches sur le système immunitaire ou le ciblage de thérapies vers le système nerveux central.

Si les PC partagent de nombreuses caractéristiques, il apparaît désormais que les PC des ventricules latéraux et les PC du 4<sup>e</sup> ventricule sont différents (Lun, Johnson, *et al.* 2015). Ces disparités de localisation et de sécrétion devront être prises en compte afin de mieux évaluer le rôle des molécules produites par l'un ou l'autre des PC. Ces différences pourraient notamment être importantes pour la régulation de la neurogenèse.

## **II- Introduction Partie 2.**

**Les plexus choroïdes, source d'Otx2 dans le  
cerveau**



Dans cette partie seront décrites les multiples fonctions propres à la famille des homéoprotéines, dont leur capacité de transfert entre cellules, un phénomène unique pour des facteurs de transcription. Ces molécules acquièrent ainsi des rôles non-cellulaire-autonomes. L'implication des homéoprotéines dans la formation du système nerveux central et son maintien ont été largement décrits, mais principalement pour leur rôle cellulaire-autonome. Nous débuterons par une description des homéoprotéines et de leur propriété de transfert entre cellules, puis nous aborderons rapidement les différentes fonctions et partenaires qui ont été identifiées. Enfin, nous verrons plus en détail les fonctions de l'homéoprotéine Otx2 dans le développement et le maintien du système nerveux central.

## **II- 1. Les homéoprotéines constituent une classe unique**

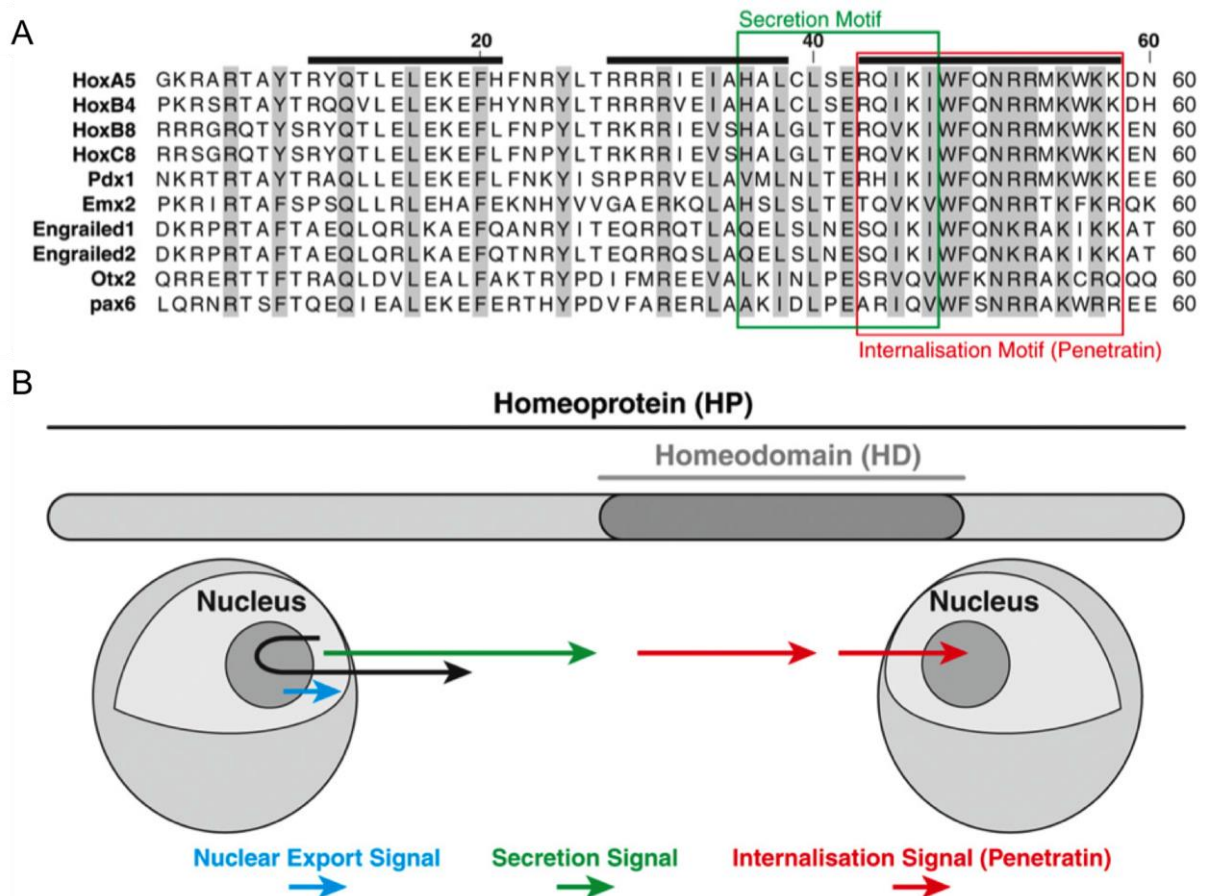
Les homéoprotéines, découvertes dans un contexte de recherche sur le développement embryonnaire précoce (Annexe B), ont également divers rôles durant le développement plus tardif et chez l'adulte. Leurs cibles et mécanismes d'action peuvent être différents selon les stades, mais également selon les régions (Partie II- 2, p. 44).

Une autre caractéristique des homéoprotéines est leur capacité à agir de manière non-cellulaire-autonome. Cela signifie que l'homéoprotéine exprimée par une cellule source est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire avant d'atteindre une cellule cible où elle agira. Cette signalisation paracrine ne doit pas faire oublier que l'homéoprotéine agit également sur les cellules qui l'expriment, de manière intracrine ou autocrine (Prochiantz & Di Nardo 2015).

### ***II- 1.a Spécificités de l'homéodomaine***

Les homéoprotéines forment une famille de plus de 200 protéines. Ces facteurs de transcription possèdent, un domaine de liaison à l'ADN très conservé de 60 acides aminés appelé homéodomaine qui est codé par une séquence appelée homéobox.

Des séquences de sécrétion et d'internalisation leur conférant leur propriété non-cellulaire-autonome ont été décrites (Figure 9). Elles se situent dans l'homéodomaine et sont donc très conservées ce qui suggère que toutes les homéoprotéines ont la possibilité de transférer et cela fut prouvé pour 13 d'entre elles *in vitro* et six *in vivo* (Sagan *et al.* 2013; Spatazza, Di Lullo, *et al.* 2013).



**Figure 9 : Les séquences de l'homéodomaine permettent le transfert entre cellules**

Les homéoprotéines possèdent un domaine très conservé de liaison à l'ADN : l'homéodomaine. (A) L'alignement de l'homéodomaine de 10 homéoprotéines montre la conservation de cette séquence. L'homéodomaine est structuré en trois hélices alpha (les lignes noires en gras). Un motif de sécrétion et un motif d'internalisation appelé Penetratin, permettant le transfert entre cellules, furent identifiés dans l'homéodomaine. Les résidus hydrophobes sont conservés dans la séquence de sécrétion qui possède également les caractéristiques d'une séquence d'export nucléaire. Dans la séquence d'internalisation, les résidus basiques en position 52, 53, 55, 57, et le tryptophane en position 48 sont conservés. (B) Schéma du transfert et de l'implication des séquences de l'homéodomaine sur ce processus. Le mécanisme de transfert atypique des homéoprotéines, qui n'implique pas le système vésiculaire pour l'internalisation, est étudié entre autres par le laboratoire d'Alain Joliot. Leurs recherches indiquent que les homéoprotéines interagissent directement avec les lipides et sucres extracellulaires de la membrane plasmique avant internalisation. Illustration de Spatazza, Di Lullo, *et al.* (2013).



## ***II- 1.b Génération de lignées scFv-homéoprotéine pour l'étude des fonctions du transfert des homéoprotéines***

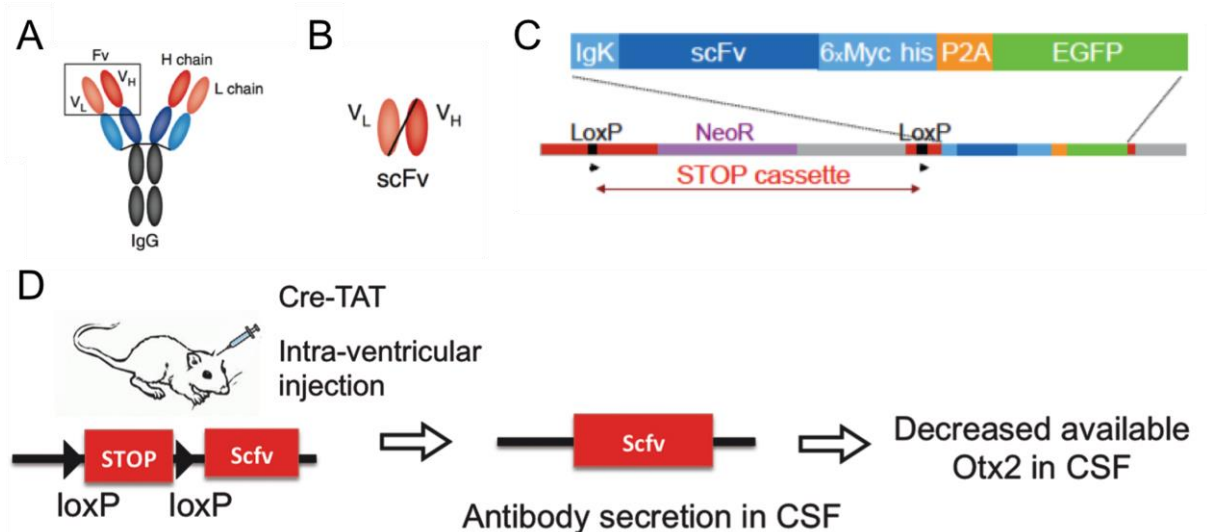
Les homéoprotéines composent une famille avec des propriétés diverses et singulières. La première découverte de rôle inattendu des homéoprotéines fut leur capacité à agir de manière non-cellulaire-autonome. Le transfert des homéoprotéines fut décrit pour la première fois dans les années 90 par le laboratoire d'Alain Prochiantz (Joliot *et al.* 1991). Depuis, l'importance du transfert des homéoprotéines a été montrée dans de nombreux contextes. Par exemple, le transfert de l'homéoprotéine Pax6 est nécessaire pour induire la formation de l'œil chez le poisson-zèbre (Lesaffre *et al.* 2007).

Etudier spécifiquement le transfert des homéoprotéines ne peut être réalisé par des expériences de mutagenèse, car les séquences de sécrétion et d'internalisation sont situées dans l'homéodomaine (Figure 9). Ainsi, muter ces séquences peut entraîner une perte de fonction de l'homéoprotéine reposant sur son rôle de facteur de transcription et non pas uniquement à cause d'une modification de sa capacité à transférer (Prochiantz & Di Nardo 2015).

### **Stratégie pour l'étude du transfert**

Afin de comprendre le rôle du transfert des homéoprotéines, il a été nécessaire de créer un outil qui empêche l'homéoprotéine d'atteindre la cellule cible : un anticorps simple chaîne de fragments variables (scFv) dirigé contre l'homéoprotéine (Figure 10A, B). Ces anticorps présentent l'avantage d'être instables dans les cellules et leur activité est donc principalement de bloquer le transfert dans le milieu extracellulaire. Ceci a permis l'étude de l'importance du transfert de Pax6 pour la formation de l'œil chez le poisson-zèbre (Lesaffre *et al.* 2007).

Plus récemment, des anticorps scFv dirigés contre les homéoprotéines Otx2 et Pax6 murin ont été développés (Figure 10C, D). Des souris transgéniques exprimant ces anticorps après induction (système Cre-lox) permettent désormais l'étude du transfert de ces homéoprotéines chez la souris (souris scFv-Otx2) (Bernard *et al.* 2016).



**Figure 10 : Utilisation d'anticorps scFv pour bloquer le transfert des homéoprotéines**

(A) Un anticorps est composé de deux chaînes lourdes (H chain) et de deux chaînes légères (L chain). Ces chaînes sont elles-mêmes composées d'une partie constante et d'une partie variable ( $V_H$  et  $V_L$ ). Chaque anticorps présente ainsi deux fragments variables ( $F_V$ ). (B) Un anticorps scFv est produit par la fusion de la partie variable de la chaîne lourde ( $V_H$ ) et de la partie variable de la chaîne légère ( $V_L$ ) d'un anticorps monoclonal, reliées par une chaîne peptidique. (C) Construction utilisée pour la création de lignées de souris transgéniques exprimant un anticorps scFv. Une cassette STOP insérée entre deux sites LoxP permet de ne pas exprimer l'anticorps avant induction par la Cre recombinase. En aval de cette cassette, la construction est composée, dans l'ordre (gauche à droite), d'un peptide de sécrétion (IgK), de la séquence de l'anticorps fusionnée à une séquence de détection composée de six répétitions du tag Myc. Enfin, un site P2A permettant de séparer l'anticorps de la protéine fluorescente GFP qui est utilisée comme un rapporteur de la zone d'expression de l'anticorps. Ainsi la protéine recombinante composée du peptide IgK, de l'anticorps et du tag Myc est sécrétée dans le milieu extracellulaire tandis que la GFP reste dans la cellule. (D) Exemple d'utilisation de la souris transgénique exprimant un anticorps scFv contre l'homéoprotéine Otx2. L'injection dans les ventricules latéraux de Cre couplé à un peptide Tat permet son internalisation dans les cellules des PC (Spatazza, Lee, *et al.* 2013). La cassette STOP est alors recombinée permettant l'expression de l'anticorps qui est sécrété dans le milieu extracellulaire, le LCS dans ce cas. L'anticorps va alors reconnaître la protéine Otx2 présente dans le LCS et bloquer son transfert en la neutralisant. Des études des effets de la diminution du transfert d'Otx2 peuvent être réalisées sans avoir modifié la protéine elle-même. Illustrations de Morrison (2007) (A, B) et Bernard *et al.* (2016) (C).

## **Reconnaissance des sucres pour un ciblage de l'internalisation**

Les homéoprotéines peuvent transférer entre les cellules, et les observations montrent que le transfert est ciblé. En effet, une homéoprotéine transfère dans les cellules de certaines zones du système nerveux central, mais pas dans sa globalité. De plus, toutes les cellules d'une région n'internalisent pas une homéoprotéine présente dans le milieu extracellulaire. Une hypothèse pour la régulation du transfert des homéoprotéines est qu'elles sont internalisées dans certains sous-types de cellules en fonction des GAG (décrit en Partie III- 3.a, p.89) présents à leur surface, et donc, de leur MEC (Bernard & Prochiantz 2016). Ainsi certains sous-types de GAG (définis par les motifs de sulfatation des sous-unités du GAG) sont présents à la surface de certaines cellules du cortex visuel et permettent le transfert spécifique d'Otx2 dans ces cellules (Partie II- 2.e, p.51). De plus, un motif de reconnaissance de ces sucres a été identifié dans la séquence d'Otx2 (Beurdeley *et al.* 2012).

D'autre part, l'internalisation d'une autre homéoprotéine, Vax1, est augmentée par son interaction avec un autre type de GAG, les héparanes sulfates, renforçant l'hypothèse d'un transfert spécifique régulé par la MEC (Kim *et al.* 2014).

### ***II- 1.c Rôle des homéoprotéines dans l'établissement et le maintien du système nerveux centrale***

De nombreuses homéoprotéines sont impliquées dans la définition des territoires du cerveau en développement (Annexe C) et dans la régulation de la neurogenèse embryonnaire (Annexe D) notamment grâce à leur capacité de transfert entre cellules. Chez l'adulte, un rôle non-cellulaire-autonome dans le système nerveux central a été démontré pour l'homéoprotéine Otx2 (Partie II- 2.e, p.51). Il est toutefois important de noter que les homéoprotéines peuvent avoir également un rôle cellulaire-autonome chez l'adulte. Ainsi l'homéoprotéine En1/2 est nécessaire au maintien des neurones dopaminergiques de la substance noire. Des souris hétérozygotes pour En1/2 présentent des caractéristiques rappelant la maladie de Parkinson avec une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques. De manière intéressante, un gain de fonction d'Otx2 est neuroprotecteur chez ces souris soulignant la redondance de fonctions des homéoprotéines (Blaudin de Thé *et al.* 2016).

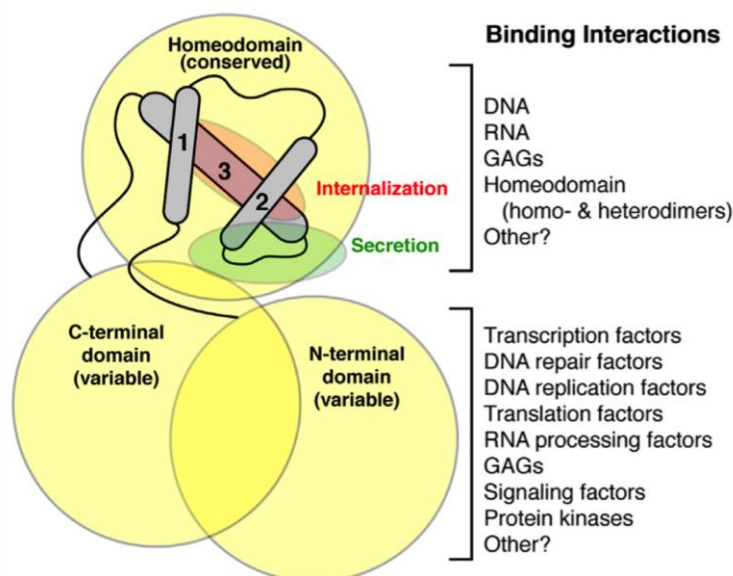
## ***II- 1.d Mécanismes d'action des homéoprotéines***

Bien que possédant une séquence de fixation à l'ADN très conservée, les homéoprotéines ont des rôles très différents. Ainsi de nombreuses recherches tentent d'élucider les mécanismes d'action des homéoprotéines en identifiant leurs partenaires (Figure 11) et leurs cibles. De plus, le rôle et les régulations par une même homéoprotéine peuvent différer entre deux types cellulaires.

En tant que facteurs de transcription, les homéoprotéines régulent l'expression de gènes cibles et se fixent donc à l'ADN. La spécificité et la modulation de leur rôle activateur ou répresseur passe, entre autres, par des interactions avec d'autres protéines (les homéoprotéines peuvent notamment former des dimères avec d'autres homéoprotéines) (Yu *et al.* 2005).

L'étude des homéoprotéines a permis de découvrir des capacités insoupçonnées pour des facteurs de transcription comme la régulation de la traduction. En effet, les homéoprotéines possèdent un site de liaison à la protéine eIF4E qui est impliquée dans la traduction des ARN messagers (ARNm). Il a été montré pour l'homéoprotéine Bicoid que sa liaison à un élément régulateur dans la partie 3' UTR de l'ARNm puis à eIF4E permet la régulation de la traduction de l'ARNm (Dubnau & Struhl 1996; Rivera-Pomar *et al.* 1996; Niessing *et al.* 2002). De plus, Bicoid peut utiliser un miARN pour réprimer l'expression d'un ARNm (Rödel *et al.* 2013). Un autre exemple est la régulation du guidage axonal par En1/2 qui implique la régulation de la traduction locale via le système mTOR (Brunet *et al.* 2005). L'interaction directe entre eIF4E et plusieurs homéoprotéines, dont Otx2, a été démontrée et suggère qu'Otx2 régule l'expression de protéines aussi via des cibles traductionnelles (Nédélec *et al.* 2004). Toutefois, aucune étude n'a prouvé à ce jour qu'Otx2 régule la traduction ou se lie à des ARN (Topisirovic & Borden 2005).

Plus récemment, la recherche de partenaires protéiques d'Otx2 dans la rétine a suggéré un rôle potentiel d'Otx2 dans la régulation l'épissage alternatif des ARN (Fant *et al.* 2015).



**Figure 11 : Partenaires des homéoprotéines**

Bien que très conservé, l'homéodomaine de différentes homéoprotéines se lie à différents domaines de l'ADN et les parties en amont et en aval de l'homéodomaine diffèrent entre homéoprotéines. De nombreux partenaires de ces parties variables ont été identifiés qui permettent d'apprécier la diversité de fonctions des homéoprotéines. Illustration de Prochiantz & Di Nardo (2015).

## II- 2. Caractéristiques de l'homéoprotéine *Otx2*

### II- 2.a Apparition d'*Otx2* dans l'évolution

*Otx2* (orthodenticle homeobox 2) (Annexe E) appartient au groupe orthodenticle comme son orthologue *Otd* (chez la drosophile) et son paralogue *Otx1* (chez les vertébrés). Un gène orthologue d'*Otx2* a été identifié chez les Cnidaires et permet de définir les axes corporels en régulant les mouvements cellulaires lors de la gastrulation. Chez les vertébrés, deux gènes *Otx* sont identifiés (parfois trois) et *Otx2* est impliqué dans la formation de la tête. En effet, dans ce phylum, le gène *Otx2* permet aux cellules de répondre à des signaux induisant une identité antérieure (Acampora *et al.* 2001).

## II- 2.b Rôle d'Otx2 dans le développement du cerveau

Les homéoprotéines et la diversité de leurs fonctions ont été décrites dans de nombreux contextes. Otx2 est nécessaire durant le développement précoce pour la mise en place du cerveau (Annexe F) et des territoires (Annexe G) puis permet le développement des cerveaux antérieur et moyen (Tableau 1, Annexe H), du cervelet, de la glande pinéale et des PC (Boyl, Signore, Acampora, *et al.* 2001; Fossat *et al.* 2006; Johansson *et al.* 2013; Hoch *et al.* 2015; Joyner *et al.* 1999; Rath *et al.* 2006; Nishida *et al.* 2003). En dehors de ses rôles dans le développement du cerveau, Otx2 est nécessaire pour le développement et le maintien de la rétine (Nishida *et al.* 2003; Beby & Lamonerie 2013; Bernard *et al.* 2014).

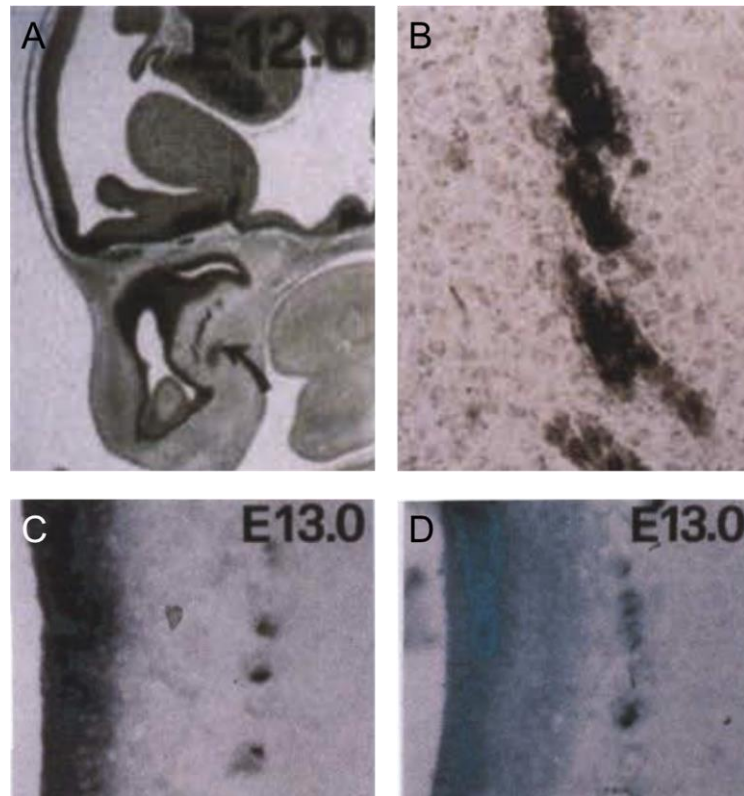
**Tableau 1 : Fonctions d'Otx2 dans le développement embryonnaire du cerveau**

(Fossat *et al.* 2006; Hoch *et al.* 2015)

Segment du cerveau	Structure étudiées	Age du KD	Effet du KD	Fonction d'Otx2 Mécanismes potentiels
Cerveau antérieur	Centre de structuration rostral (CSR)	E8.5	Expression de marqueurs des cerveaux moyens et postérieurs dans des progéniteurs du télencéphale	Otx2 est nécessaire à la spécification des progéniteurs Dé-répression de l'expression des FGFs produit par le CSR
	Eminence ganglionnaire médiane (EGM)		Diminution des marqueurs d'oligodendrocytes	Otx2 régule l'oligodendrogenèse Régulation de l'expression des gènes Olig
	Eminence ganglionnaire médiane ventrale (EMGv)		Diminution des marqueurs de neurones de la EGM	Otx2 régule la neurogenèse Diminution de la prolifération des progéniteurs
	Eminence ganglionnaire médiane et septum		Augmentation des marqueurs de l'aire pré-optique et diminution des marqueurs de la EMGv	Otx2 est nécessaire à la spécification des progéniteurs Spécification des neurones de l'EMGv et répression de l'identité de l'aire pré-optique
Cerveau moyen	Cerveau moyen ventral	E10.5 et E12.5	Diminution du nombre de neurones dopaminergiques	Otx2 régule la formation des neurones dopaminergiques Contrôle de la différenciation
	Cerveau moyen dorsal	E12.5 et E14.5	Absence de la portion médiale du colliculus inférieur	Otx2 permet le développement des colliculus inférieurs Changement d'identité des progéniteurs et diminution de la prolifération
Cerveau postérieur	Cervelet postérieur	E16.5	Cervelet moins développé avec des défauts de foliation	Otx2 permet le développement du cervelet

### ***II- 2.c Rôle d'Otx2 dans le développement du système olfactif***

Dans leur étude de caractérisation d'Otx2 durant le développement embryonnaire, Mallamaci *et al.* (1996) ont observé la présence de la protéine dans le système olfactif (Figure 12). A E10, Otx2 est exprimée dans la placode olfactive (qui donnera le système olfactif) et son expression augmente ensuite dans la partie profonde des fosses nasales en développement. Cette zone formera l'épithélium olfactif à E12 qui possède quelques cellules exprimant Otx2. Ces cellules sont des cellules de support différenciées qu'on peut comparer avec les cellules gliales du cerveau, car elles permettent d'apporter un soutien métabolique aux autres cellules. A E12, Otx2 commence à être exprimée dans des clusters de cellules localisés entre les fosses nasales et formant des tunnels depuis l'épithélium olfactif jusqu'aux BO. Ces clusters de cellules, marquées par GFAP et LHRH, entourent les faisceaux d'axones migrant jusqu'aux BO. Le rôle d'Otx2 sur la migration de ces axones n'a pas été étudié (Mallamaci *et al.* 1996).



**Figure 12 : Expression d'Otx2 dans le système olfactif en développement**

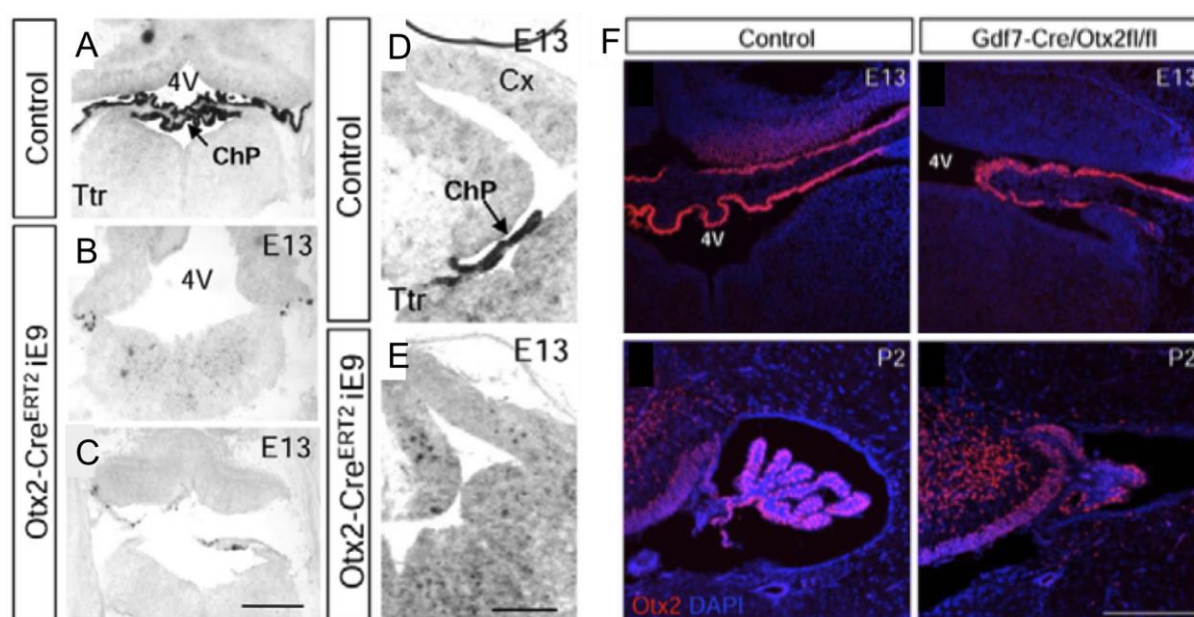
(A-B) Comarquage d'Otx2 (en marron) et Tau (Violet foncé/noir) afin d'observer les processus cellulaires. (A) Sur cette coupe transverse de la tête, Otx2 est détecté dans le système olfactif. (B) Agrandissement de la zone pointée par une flèche. On peut voir la structure tubulaire des clusters de cellules exprimant Otx2. (C) Co-marquage d'Otx2 (gris/bleu) et LHRH (marron). (D) Co-marquage d'Otx2 (bleu) et GFAP (marron). Illustrations de Mallamaci *et al.* (1996).



## II- 2.d *Otx2* est un régulateur du développement des plexus choroïdes

### L'expression d'*Otx2* est requise pour le développement des plexus choroïdes

Le rôle d'*Otx2* dans le développement des PC a été décrit dans l'étude de Johansson *et al.* (2013). En utilisant une stratégie de délétion inducible d'*Otx2* dans ses zones d'expression, les auteurs ont montré que l'expression d'*Otx2* est nécessaire au développement et au maintien des PC. Une délétion à E9 entraîne l'absence de tous les PC à E13. Ainsi l'expression d'*Otx2* est requise pour le développement des PC (Figure 13A-E).



**Figure 13 : L'expression d'*Otx2* est nécessaire au développement des PC**

Des hybridations *in situ* de *Ttr* sur coupes coronales montrent qu'à E13, les PC du 4<sup>e</sup> ventricule (A) et des ventricules latéraux (D) sont bien développés et expriment *Ttr* chez des animaux contrôles. L'induction du knockdown d'*Otx2* à E9 entraîne l'absence des PC du 4<sup>e</sup> ventricule (B et C) et des ventricules latéraux (E). L'absence du PC du 3<sup>e</sup> ventricule n'est pas illustrée ici. 4V : 4<sup>e</sup> ventricule ; ChP : plexus choroïde ; Cx : cortex. (F) Le knockdown spécifique du 4<sup>e</sup> ventricule grâce à l'expression de la Cre sous promoteur *Gdf7* entraîne également le défaut de développement du PC du 4<sup>e</sup> ventricule à E13 qui se après la naissance, à P2, bien que certaines cellules continuent d'exprimer *Otx2*. Barres d'échelle 50 μm (A-E) et 200 μm (F). Illustrations de Johansson *et al.* (2013).

### **La délétion d'Otx2 dans le plexus choroïdes du 4<sup>e</sup> ventricule augmente l'apoptose et diminue la prolifération cellulaire**

Les auteurs ont ensuite réalisé un knockdown d'Otx2 plus spécifique permettant d'éteindre l'expression d'Otx2 dans les progéniteurs du PC du 4<sup>e</sup> ventricule. Cette délétion commence à E11/12 et est effective à E13 bien qu'elle ne soit pas totale, le PC présente une taille diminuée (Figure 13F). Des analyses par tri cellulaire ont révélé une augmentation du nombre de cellules en apoptose après délétion d'Otx2. De plus, cette délétion entraîne une diminution de la prolifération cellulaire. Ainsi une augmentation de l'apoptose et une diminution de la prolifération contribuent au problème de développement du PC dans le mutant (Johansson *et al.* 2013).

### **L'expression d'Otx2 dans le plexus choroïde du 4<sup>e</sup> ventricule régule la neurogenèse embryonnaire en modifiant la composition du liquide cébrospinal**

L'utilisation de ces animaux présentant une délétion spécifique d'Otx2 dans le PC du 4<sup>e</sup> ventricule a également permis de mettre en évidence l'importance d'Otx2 dans la régulation de la production du LCS. En effet, après knockdown, le LCS présente une augmentation de la concentration de protéines totales à E13. Comparé à du LCS d'animaux contrôles, l'addition de ce LCS sur des cultures primaires de cortex augmente le nombre de cellules après 3 jours. Ceci semble dû à un changement de composition plutôt qu'à une simple augmentation de la quantité de protéines. De plus, la délétion d'Otx2 entraîne une diminution de prolifération dans le cortex à E13. Ainsi, la sécrétion de LCS par le PC du 4<sup>e</sup> ventricule est un régulateur de la neurogenèse *in vivo*, et Otx2, en régulant son développement, est un potentiel élément régulateur de la composition du LCS (Johansson *et al.* 2013).

### **L'expression d'Otx2 est nécessaire au maintien du plexus choroïde du 4<sup>e</sup> ventricule**

Afin de connaître l'implication d'Otx2 dans le maintien des PC, une délétion à E15, après le développement des PC, a été réalisée. Ceci entraîne une diminution de la taille du PC du 4<sup>e</sup> ventricule, mais pas des autres PC (Figure 14). Otx2 est donc requise pour le maintien du PC du 4<sup>e</sup> ventricule uniquement (Johansson *et al.* 2013).

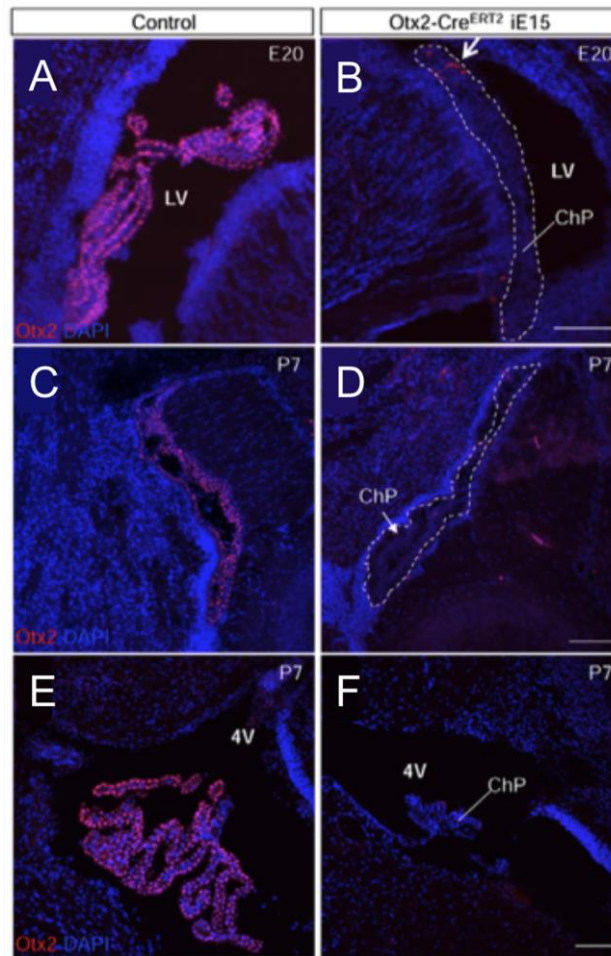


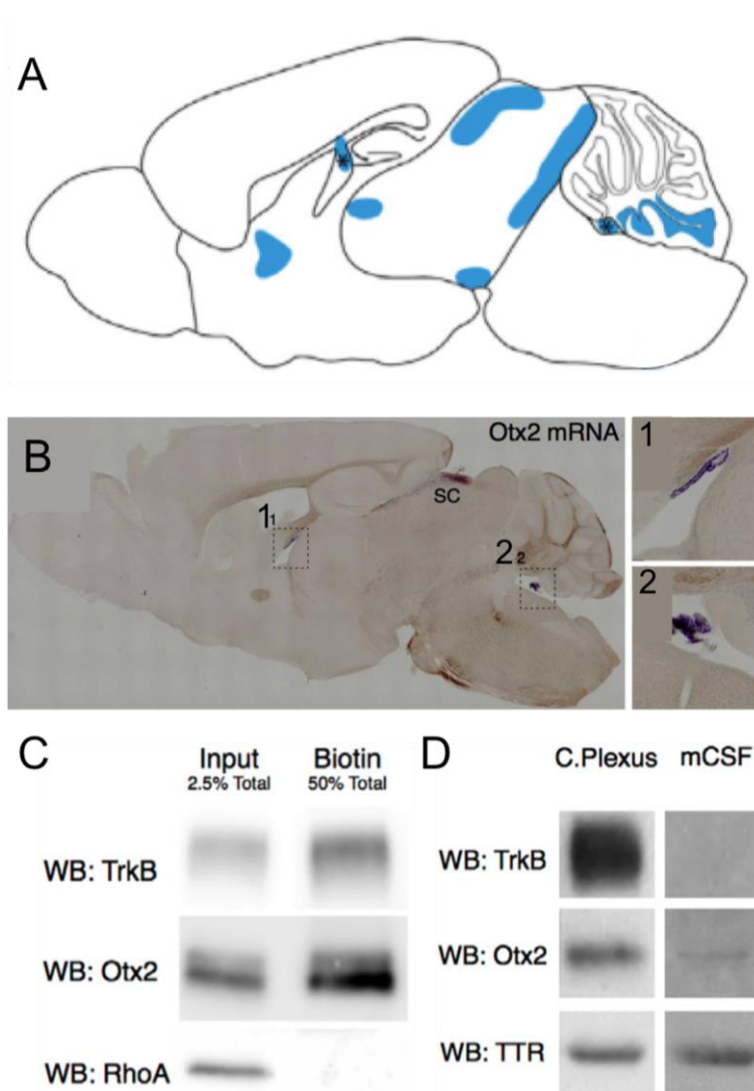
Figure 14 : L'expression d'Otx2 est nécessaire au maintien du PC du 4<sup>e</sup> ventricule.

Des marquages immunohistochimiques d'Otx2 sur coupe coronale de souris injectée avec la Cre-Tat démontrent l'efficacité du knockdown d'Otx2 après 5 jours d'induction (B) comparé au contrôle exprimant fortement Otx2 (A). 12 jours après induction du knockdown, Otx2 n'est pas exprimée dans les PC des ventricules latéraux qui présentent une taille et une morphologie similaires (D) au PC des animaux contrôle (C). En revanche, en comparaison du contrôle (E), le PC du 4<sup>e</sup> ventricule présente une atrophie (F). LV : ventricule latéral ; ChP : plexus choroïde ; 4V : 4<sup>e</sup> ventricule. Barre d'échelle 100 µm. Illustrations de Johansson *et al.* (2013).

## ***II- 2.e Otx2 dans le système nerveux central adulte***

### **Sites d'expression d'Otx2 chez l'adulte**

Chez l'adulte, *Otx2* est exprimé dans certaines régions restreintes (Figure 15A). Il a été montré que les PC expriment et sécrètent *Otx2* dans le LCS (Figure 15B, C, D). Ils sont une source d'*Otx2* pour le cortex visuel et le rôle du transfert d'*Otx2* a été caractérisé (Bernard *et al.* 2016; Beurdeley *et al.* 2012; Sugiyama *et al.* 2008; Spatazza, Lee, *et al.* 2013; Larsen *et al.* 2010).



**Figure 15 : Expression d'*Otx2* dans le cerveau adulte**

(A) De gauche à droite, *Otx2* est exprimé dans le septum médian, les PC des ventricules latéraux, le corps géniculé latéral, les colliculus supérieurs (en haut), l'aire tegmentale ventrale (en bas), les colliculus inférieurs, les PC du 4<sup>e</sup> ventricule) et le cervelet. Il est important de noter que ce schéma montre les zones d'expression d'*Otx2*, mais que la protéine est présente dans d'autres zones telles que le cortex visuel. (B) L'ARNm d'*Otx2* est détecté dans les PC et dans le colliculus supérieur (SC) par hybridation *in situ* sur une coupe sagittale de cerveau de souris adulte. (1) PC d'un ventricule latéral. (2) PC du 4<sup>e</sup> ventricule. (C) *Otx2* est détectée à la surface des cellules par une expérience de biotinylation de surface des PC. L'extrait de PC entier (input) montre les protéines extracellulaires TrkB et intracellulaire RhoA. La biotinylation de surface montre qu'une fraction de la protéine *Otx2* est extracellulaire. (D) Ce Western Blot sur des extraits de PC et du LCS de souris (mCSF) démontre que de l'*Otx2* est sécrétée dans le LCS. TrkB, une protéine transmembranaire, est utilisée comme contrôle négatif et montre que les extraits de LCS ne sont pas contaminés par du PC. TTR est un contrôle positif puisque cette protéine est connue pour être sécrétée par les PC dans le LCS. (C-D) Ces expériences suggèrent qu'*Otx2* est sécrétée par les PC. Illustrations de Prochiantz & Di Nardo (2015) (A) et Spatazza, Lee, *et al.* (2013) (B-D).

### **Fonction non-cellulaire-autonome dans le cortex visuel binoculaire**

Le transfert d'Otx2 dans les interneurons à parvalbumine de la couche 4 du cortex visuel permet de réguler la plasticité du cortex visuel et été montré notamment par l'utilisation de souris scFv-Otx2 (Bernard *et al.* 2016). La plasticité est le phénomène de remodelage des connexions (ou de la force des connexions) en fonction des stimuli. Dans le cas du cortex visuel, le stimulus est une information sensorielle provenant de l'œil. Les périodes de forte plasticité pendant le développement postnatal sont appelées périodes critiques et permettent la maturation des réseaux neuronaux. La période critique de dominance oculaire du cortex visuel se situe entre le jour postnatal (P) 20 et P40 et nécessite la maturation des interneurons exprimant la parvalbumine. Si on suture l'œil d'une souris durant cette période, il y a un remodelage des connexions dans le cortex binoculaire qui favorise les connexions de l'œil ouvert. On observe alors une diminution de l'acuité visuelle de l'œil fermé (amblyopie). Suturer l'œil d'une souris avant ou après cette période n'a que peu de conséquences sur l'acuité visuelle de l'œil fermé (Bernard & Prochiantz 2016).

*Otx2* n'est pas exprimé dans ces cellules et on observe une accumulation croissante d'Otx2 au cours de la maturation des cellules à parvalbumine. L'infusion d'Otx2 dans le cortex visuel entraîne sa capture par les cellules à parvalbumine et une accélération de l'ouverture et de la fermeture de la période critique (Sugiyama *et al.* 2008). Cette accumulation spécifique met en jeu les GAG, plus particulièrement les chondroïtines sulfates de types D/E (CS-D et CS-E), de la MEC des cellules à parvalbumine. (Despras *et al.* 2013; Beurdeley *et al.* 2012).

Paradoxalement, la période critique se ferme quand le niveau d'internalisation d'Otx2 dans les cellules à parvalbumine a atteint un certain seuil. Ainsi, empêcher le transfert d'Otx2 chez l'adulte entraîne une réouverture de la période critique, et une souris ayant une acuité visuelle diminuée retrouvera une vision normale (Spatazza, Lee, *et al.* 2013). Le transfert d'Otx2 permet donc la régulation de la période critique du cortex visuel (Figure 16).

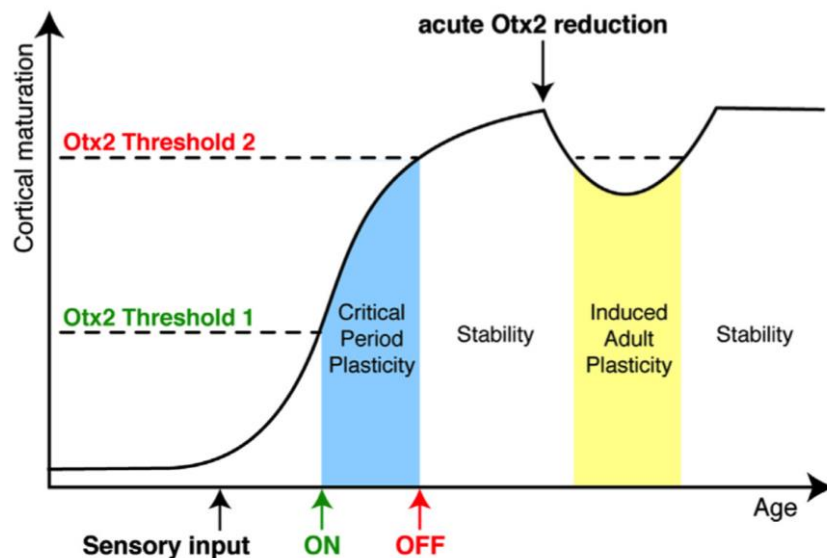


Figure 16 : Schéma du rôle de l'internalisation d'Otx2 sur la maturation corticale

Lorsque l'œil perçoit ses premiers stimuli, le circuit visuel commence sa maturation et Otx2 est internalisée dans les cellules à parvalbumine de la couche 4 du cortex visuel. Lorsqu'elles ont internalisé suffisamment d'Otx2, la période critique commence vers P20, en bleu, et les réseaux subissent d'importantes réorganisations en fonction des stimuli visuels. L'internalisation d'Otx2 continue durant cette période et un second seuil est atteint à la fin de la période critique vers P40, permettant de la fermer. Le système est alors mature et les connexions entre neurones restent stables. Toutefois, il est possible d'ouvrir une nouvelle période de plasticité chez l'adulte, en empêchant l'internalisation d'Otx2. Illustration de Prochiantz & Di Nardo (2015).

## ***II- 2.f Cibles transcriptionnelles identifiées d'Otx2***

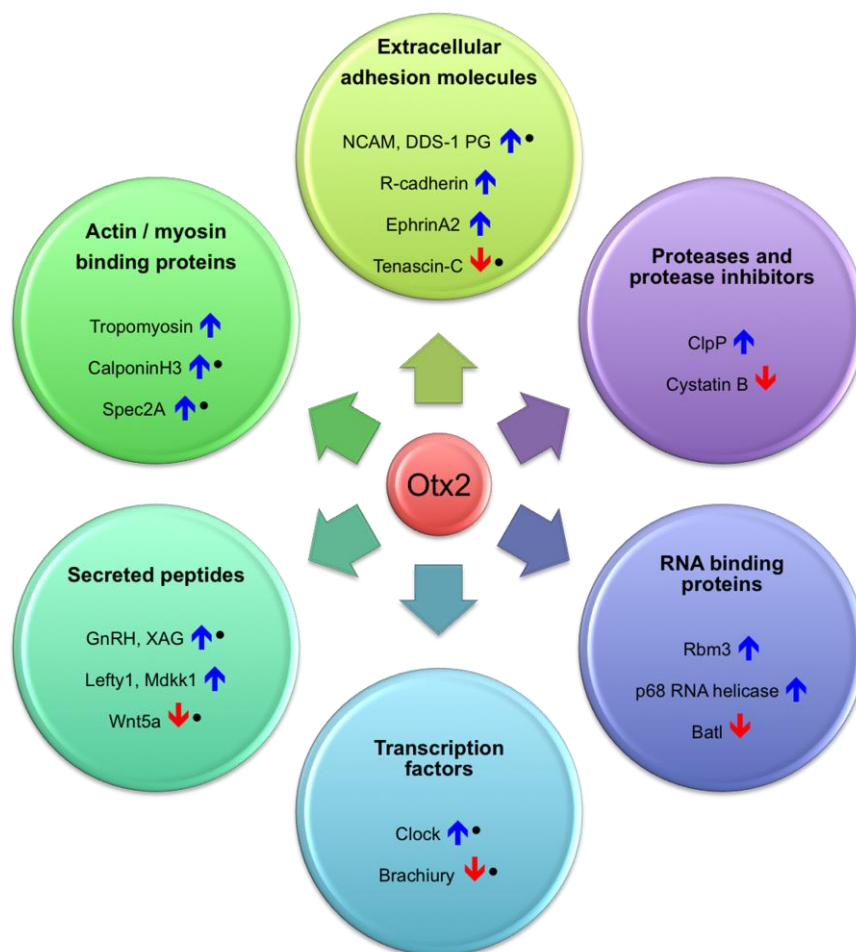
Différentes approches ont été utilisées afin d'identifier des cibles transcriptionnelles d'Otx2, le plus souvent dans un contexte développemental. Les cibles identifiées peuvent être classées en six catégories fonctionnelles (Figure 17). Otx2 peut agir de manière à activer ou à réprimer l'expression de gènes. Certaines de ces cibles directes sont impliquées dans la composition de la MEC et ont donc un intérêt particulier dans un contexte de période critique ou de neurogenèse tel que la Ténascine-C (Tnc) ou le protéoglycan DSD-1 (Boncinelli & Morgan 2001). La thrombospondine-1 est également surexprimée dans un modèle *in vitro* de neurones rétiniens surexprimant Otx2 (Nguyen-Ba-Charvet *et al.* 1998).

Une étude sur le rôle d'Otx2 dans le développement du télencéphale ventral (Annexe H) a également permis d'identifier de nombreuses cibles transcriptionnelles d'Otx2 en combinant des résultats de microarray et de ChIP-seq (Hoch *et al.* 2015). Ces auteurs ont ainsi pu identifier des motifs de liaisons à l'ADN d'Otx2, mais également les zones génomiques enrichies ne possédant pas de site spécifique pour Otx2. Ainsi les auteurs proposent qu'Otx2 puisse interagir avec l'ADN grâce à des partenaires protéiques. Leurs résultats suggèrent également qu'Otx2 régule l'expression de gènes contrôlant la formation des neurones issus de l'éminence ganglionnaire médiane. Otx2 ne régule pas la neurogenèse dans les autres éminences ganglionnaires bien qu'elle y soit exprimée montrant la diversité des rôles d'Otx2 aussi bien au niveau transcriptionnel que fonctionnel (Hoch *et al.* 2015).

## ***II- 2.g Implications pathologiques***

Chez l'Homme, *OTX2* est impliquée dans deux types majeurs de maladies à savoir des malformations et les médulloblastomes. Des mutations d'*OTX2* peuvent entraîner une haplo-insuffisance et de nombreux phénotypes de défauts ou malformations du cerveau, de l'hypophyse et de l'œil. Les malformations des yeux sont très diverses, allant de l'anophtalmie à une dystrophie de la rétine. Concernant le cerveau, les malformations peuvent être un défaut de développement d'une structure, mais également une hydrocéphalie. Les médulloblastomes sont des tumeurs malignes du cervelet chez l'enfant. Divers éléments montrent le rôle d'*OTX2* dans la régulation





**Figure 17 : Cibles d'Otx2**

Exemples de cibles d'Otx2 classées selon leurs fonctions. Otx2 peut aussi bien activer que réprimer l'expression d'un gène. Ceux activés ont une flèche bleue tandis que ceux dont l'expression est réprimée par Otx2 ont une flèche rouge. Selon le type d'approche utilisée, la cible concernée a pu être identifiée comme directe et est annotée ici par un point à côté de la flèche. Ainsi, sur ces cibles directes, Otx2 peut agir aussi comme activateur que répresseur, probablement par l'interaction avec d'autres protéines. Illustration adaptée à partir de Boncinelli & Morgan (2001).

de cette maladie. Des surexpressions et des duplications d'OTX2 sont observées dans des tumeurs primaires. De plus, des knockdown d'OTX2 permettent de limiter la croissance tumorale *in vitro*. Enfin, OTX2 agit comme un répresseur de la différenciation dans les médulloblastomes (Bebby & Lamonerie 2013).

## ***II- 2.h Indications thérapeutiques potentielles***

Otx2 permet de réguler la plasticité du cortex visuel et diminuer son transfert permet de rétablir l'acuité visuelle chez des souris amblyopes. Cette maladie touche 2 à 5% de la population mondiale et bien que les traitements soient efficaces chez l'enfant, il reste des cas chez l'adulte. Il est ainsi possible d'imaginer une transduction des PC afin de diminuer l'expression d'Otx2 provisoirement avec des ARN interférents (Prochiantz & Di Nardo 2015).

## **II- 3. Conclusion Partie 2**

Les homéoprotéines régulent de nombreux processus développementaux. Les partenaires des homéoprotéines sont multiples et l'on peut soupçonner qu'elles peuvent interagir avec tout le panel de molécules présentes dans les cellules allant de l'ADN au miARN, des protéines, des lipides, des sucres, *etc.* (Prochiantz & Di Nardo 2015).

L'homéoprotéine Otx2 est un régulateur de la formation du système nerveux central, de la neurogenèse embryonnaire et elle permet également de contrôler, en postnatal et chez l'adulte, les réseaux neuronaux mis en place au cours du développement (Acampora *et al.* 2001; Fossat *et al.* 2006; Hoch *et al.* 2015; Sugiyama *et al.* 2008; Spatazza, Lee, *et al.* 2013). La variété des cibles d'Otx2 permet d'appréhender les divers rôles que peut exercer une homéoprotéine (Boncinelli & Morgan 2001). En effet, selon la cellule qui exprime ou internalise Otx2, les cibles diffèrent, notamment à cause de partenaires protéiques distincts. L'internalisation est un processus régulé grâce à l'interaction avec la MEC qui permet un ciblage spécifique dans certains sous-types de cellules (Bernard & Prochiantz 2016).

L'étude du transfert des homéoprotéines nécessite des outils particuliers. Des souris transgéniques exprimant des anticorps scFv dirigés contre une homéoprotéine ont été développées, comme la lignée scFv-Otx2, ouvrant la voie à une meilleure compréhension des fonctions du transfert des homéoprotéines (Lesaffre *et al.* 2007; Bernard *et al.* 2016).

En plus de réguler la neurogenèse, Otx2 pourrait jouer un rôle dans les cellules gliales. En effet, Otx2 est détectée dans les cellules de Müller d'embryon de poulet,

qui sont des cellules gliales de l'œil, et dans les cellules gliales du système olfactif en développement chez la souris (Mallamaci *et al.* 1996; Bovolenta *et al.* 1997). Dans le système nerveux central adulte, aucune étude n'a montré l'expression ou le transfert d'Otx2 dans les cellules gliales.

L'expression d'Otx2 est également nécessaire au développement des PC et après leur mise en place, Otx2 permet le maintien du PC du 4<sup>e</sup> ventricule (Johansson *et al.* 2013). Toutefois, le rôle d'Otx2 sur les PC adulte n'a pas été étudié. Etant donné leur rôle de régulateur de l'homéostasie cérébrale, une atteinte de l'expression d'Otx2 chez l'adulte pourrait modifier la fonction des PC. De plus, le transfert d'Otx2, produit par les PC, est important chez l'adulte pour réguler la plasticité corticale (Spatazza, Lee, *et al.* 2013). Toutefois, un possible rôle du transfert d'Otx2, produit par les PC, sur la neurogenèse n'a pas encore été étudié.

### **III- Introduction Partie 3.**

**Les plexus choroïdes sont des régulateurs de la  
neurogenèse adulte**



Dans cette partie seront décrits les mécanismes de formation, chez l'adulte, des nouveaux neurones pour le BO depuis la zone sous-ventriculaire (ZSV), ainsi que les mécanismes de régulation de ce processus de neurogenèse adulte. Les cellules souches de différents organes reposent dans un micro-environnement spécialisé, appelé niche. Ces niches contiennent les cellules souches, les progéniteurs générés, des vaisseaux sanguins et d'autres cellules de support ainsi qu'une MEC particulière (Faissner & Reinhard 2015).

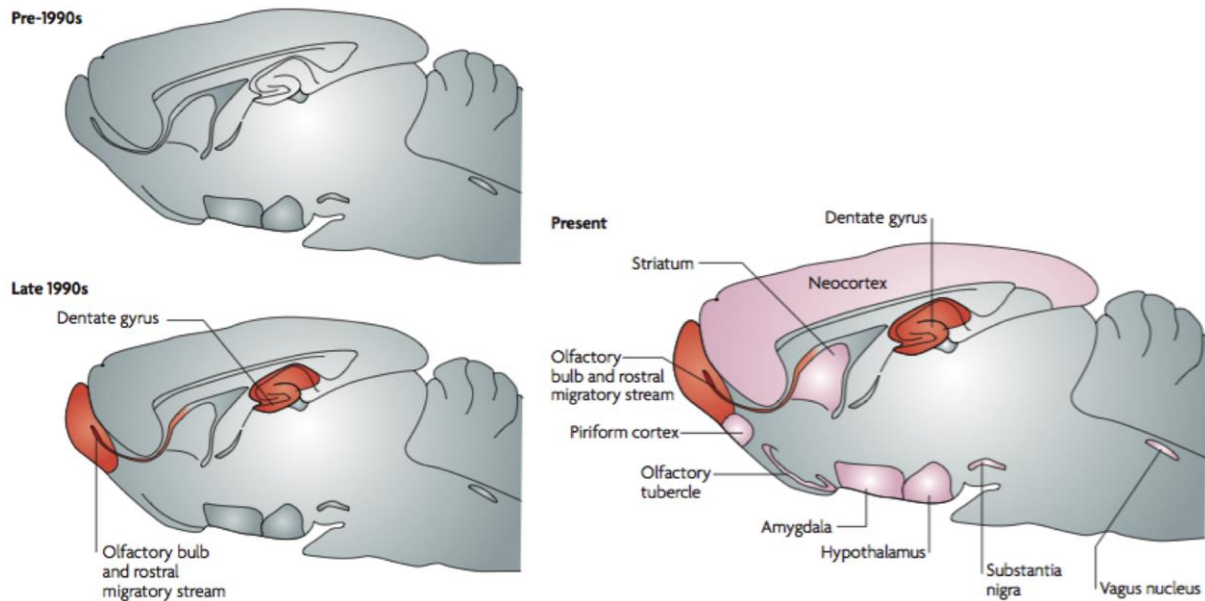
Nous commencerons par une revue sur le processus et le rôle de la neurogenèse adulte. Nous verrons ensuite sa régulation par les différentes composantes cellulaires de la niche et par la MEC. Nous aborderons ensuite le problème de l'hétérogénéité des astrocytes dont les cellules souches neurales adultes font partie. Enfin, le rôle des PC dans la régulation de la neurogenèse adulte sera décrit.

L'emploi du terme neurogenèse permettra de définir l'ensemble du processus, de la prolifération des progéniteurs jusqu'à l'intégration de nouveaux neurones chez l'adulte. Les cellules souches seront désignées comme telles, et n'entrent pas dans la catégorie des progéniteurs.

### **III- 1. De nouveaux neurones sont générés dans le cerveau adulte**

#### ***III- 1.a La formation de nouvelles cellules dans le cerveau adulte est un élément de la plasticité du cerveau***

Le cerveau fut longtemps considéré comme un organe fixe chez l'adulte, sans capacité d'adaptation. Le développement des techniques permet désormais de visualiser la formidable plasticité de cet organe où de nouvelles cellules sont générées tout au long de la vie : des oligodendrocytes, des astrocytes et des neurones. Toutefois, cette formation de cellules est hautement régulée et répond à des besoins précis. Ainsi les précurseurs des oligodendrocytes se divisent tout au long de la vie dans toutes les régions du cerveau, mais plus rapidement dans les zones composées de matière blanche afin de reformer des gaines de myéline autour des axones (Young *et al.* 2013). Concernant la formation de nouveaux neurones, celle-ci se fait de manière beaucoup plus importante et localisée. Chez la souris, il existe deux zones préférentielles d'intégration des nouveaux neurones: le gyrus dentelé dans l'hippocampe et le BO (Figure 18) (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009). De 10 000 à 80 000 nouveaux neurones sont générés chaque jour dans le BO du rat et 9 000 dans le gyrus dentelé (Pignatelli & Belluzzi 2010). Toutefois, la présence de neurogenèse dans d'autres régions reste un sujet débattu (Figure 18) (Gould 2007).



**Figure 18 : Evolution de la notion de neurogenèse adulte**

Le cerveau fut longtemps considéré comme un organe fixe chez l'adulte, sans possibilité d'évolution. Cette vision a fortement évolué notamment par l'observation de nombreux phénomènes de plasticité tels que l'évolution des synapses en réponse à l'activité cérébrale. Concernant la neurogenèse adulte, divers travaux ont suggéré la présence de cellules en division dès 1912 et Altman apporta de nombreux éléments en faveur d'une neurogenèse chez l'adulte dans les années 60 (Chojnacki *et al.* 2009), mais il faudra attendre les années 90 pour prouver la formation de nouveaux neurones chez la souris adulte. En effet, l'utilisation des analogues de thymidine par Altman laissa sceptique la communauté scientifique, car cette méthode peut entraîner un marquage des cellules post-mitotiques qui incorporent l'analogue durant la réparation de l'ADN (Parades 2015). Si la génération de cellules pour le BO et le gyrus dentelé dans le cerveau de souris et de rat n'est plus sujette à controverse aujourd'hui (en rouge), la neurogenèse dans d'autres régions du cerveau (en rose) est toujours en débat. Illustration de Gould (2007).



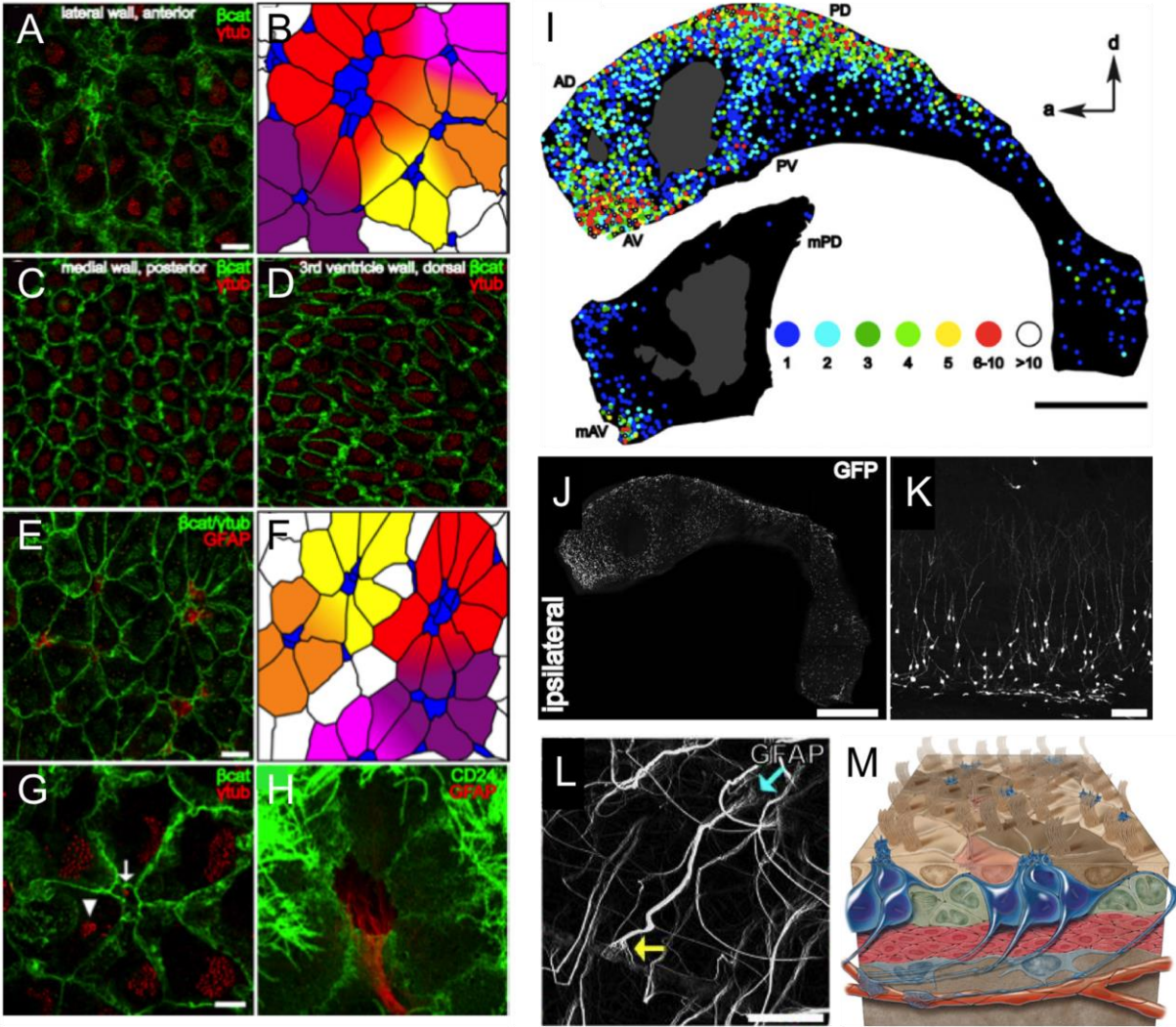
### ***III- 1.b Des progéniteurs localisés dans la zone sous-ventriculaire produisent des nouveaux neurones dans le bulbe olfactif de la souris***

Les neurones générés dans le BO trouvent leur origine dans les cellules souches neurales adultes localisées dans la ZSV, appelées aussi cellules de type B1. Ces cellules sont localisées le long du mur ventriculaire latéral et dans la partie antérieure du mur médian et il existe également des cellules souches dans le courant de migration rostral (CMR, description ci-dessous) (Doetsch *et al.* 1997; Mirzadeh *et al.* 2008; Gritti *et al.* 2002).

Les cellules souches de la ZSV projettent un cil, qui contacte le LCS, entre les cellules épendymaires qui constituent le mur ventriculaire. On observe alors une structure particulière, dite en pinwheel, lorsque l'on observe la ZSV en face (Figure 19). Le processus basal de ces cellules contacte les vaisseaux sanguins de la ZSV (Figure 19L, M) (Mirzadeh *et al.* 2008). Ces cellules sont soit quiescentes, soit en état activé, cet état pouvant être induit par des facteurs extrinsèques afin de produire des progéniteurs (Codega P *et al.* 2014, Llorens-Bobadilla *et al.* 2015). Tout d'abord considérées comme multipotentes, car capable de former des neurones, des astrocytes (Sohn *et al.* 2015) et des oligodendrocytes (Menn *et al.* 2006 ; Tong *et al.* 2015), les cellules souches neurales sont en fait spécialisées pour produire un type ou sous-type cellulaire (Young 2007 ; Ortega 2013) (Partie III- 4.B, p. 105). La majeure partie des progéniteurs générée par les cellules souches sont les progéniteurs de type C, qui se divisent rapidement et constituent ainsi le pool d'amplification. Ces progéniteurs produisent alors des neurones immatures, dits cellules de type A ou neuroblastes (Doetsch *et al.* 1999). Une étude du cycle cellulaire des progéniteurs suggère que les progéniteurs de type C se divisent trois fois et les neuroblastes une ou deux fois (Ponti *et al.* 2013).

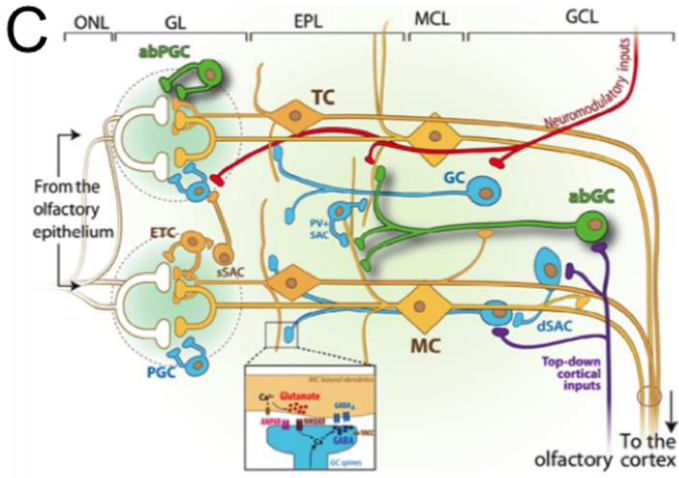
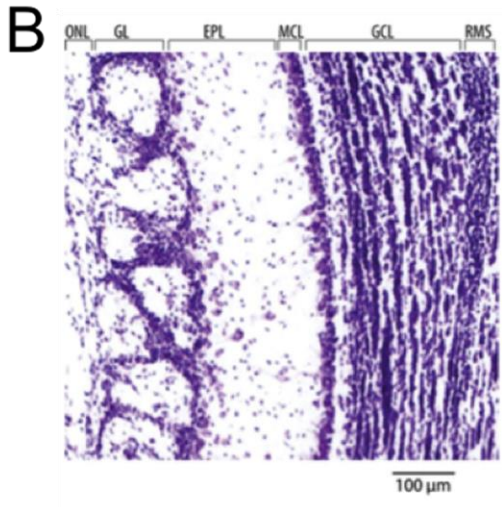
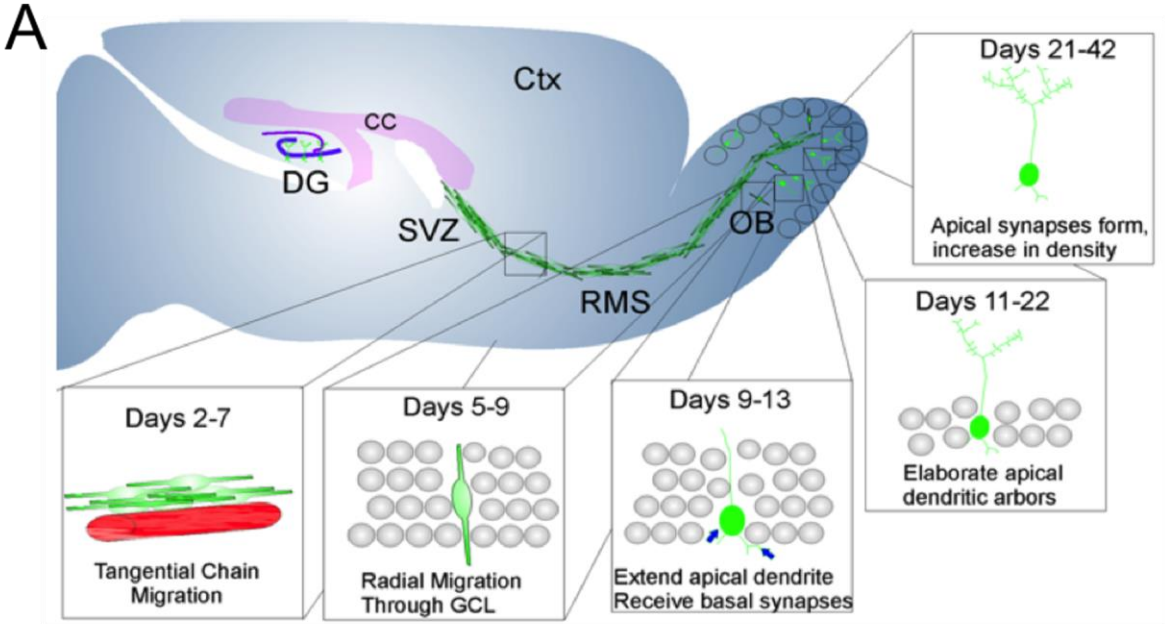
Ces neuroblastes vont alors migrer sur une longue distance (3-8mm) à raison de 120  $\mu\text{m}/\text{h}$  dans le CMR jusqu'à atteindre le BO (Figure 20A) (Doetsch & Alvarez-Buylla 1996; Wichterle *et al.* 1997). Lorsque ces progéniteurs atteignent le BO, ils migrent de manière radiale pour s'intégrer dans le réseau et remplacer les interneurones existants. L'intégration prendra place dans la couche de cellules granulaires ou dans la couche glomérulaire (Figure 20B, C) (Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo 2002; Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009). Des études sur le rat ont montré que le nombre de neurones générés est très important et représente 1% du nombre de

cellules granulaires dans le BO. Toutefois, seule la moitié s'intégrera durablement dans le réseau, l'autre moitié des cellules générées étant éliminée par apoptose (Winner *et al.* 2002). La mort de ces cellules a lieu principalement dans le BO. En effet, bien que l'on observe de la mort cellulaire dans la ZSV et le CMR, celle du BO représente plus de 80% des cellules identifiées par un essai TUNEL (Biebl *et al.* 2000).



**Figure 19 : La ZSV abritant les cellules souches neurales présente une organisation unique**

(A-H, L, M) Des immunomarquages des membranes des cellules épendymaires ( $\beta$ -catenin,  $\beta$ cat ; CD24) et de leur cil ( $\gamma$ -tubuline,  $\gamma$ tub) ainsi que des cellules souches neurales (GFAP) ont permis de visualiser l'organisation particulière de la ZSV grâce à des acquisitions au microscope confocal. (A) Dans la ZSV, on observe la formation de pinwheels au centre des cellules épendymaires. Barre d'échelle 10  $\mu$ m. (B) La reconstruction de l'image (A) montre le centre des pinwheels en bleu et les différents pinwheels sont illustrés par différentes couleurs. (C, D) Cette structure est unique à la ZSV. En effet, dans la partie postérieure du mur médian et le long du 3<sup>e</sup> ventricule on observe une répartition homogène et des formes plus régulières des cellules épendymaires. (E) Les cellules souches neurales se trouvent au centre du pinwheel. Barre d'échelle 10  $\mu$ m. (F) Reconstruction de l'image (E). (G) La membrane des cellules épendymaires présente une structure en forme de diamant très caractéristique. La flèche indique le cil d'une cellule souche neurale au centre du pinwheel. Barre d'échelle 5  $\mu$ m. (H) Structure du pinwheel avec la cellule souche neurale au centre. (I) Reconstruction de la position des clusters des projections apicales des cellules souches neurales (au centre des pinwheel). La densité de processus apical dans un même pinwheel est indiquée par le code couleur. La zone grise dénote le point d'attachement des murs latéral et médian. Barre d'échelle 1 mm. (J) L'injection d'un adénovirus codant pour la GFP dans le ventricule permet de visualiser de nombreuses cellules souches neurales le long de la ZSV. Barre d'échelle 1 mm. (K) 30 jours après l'injection du virus on trouve des cellules GFP + dans le BO. Barre d'échelle 100  $\mu$ m. (L) La partie apicale d'une cellule souche projette un cil (flèche bleue) dans le ventricule tandis que sa partie basale contacte un vaisseau sanguin et forme un pied astrocytaire (flèche jaune). Barre d'échelle 25  $\mu$ m. (M) Illustration 3D de la structure de la ZSV. Les cellules souches neurales en bleu forment des clusters de projections apicales, au centre des pinwheels formés par les cellules épendymaires en marron (clair et foncé) et pêche, et contactent les vaisseaux sanguins en orange. Les progéniteurs de type C en vert et les neuroblastes en rouge ne contactent pas le ventricule et sont localisés sous les cellules épendymaires. Illustrations adaptées à partir de Mirzadeh *et al.* (2008).



## Figure 20 : Migration des progéniteurs et intégration des neurones produits par la ZSV

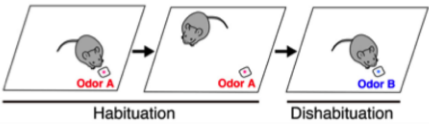
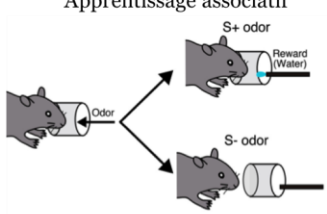
(A) Schéma montrant les différentes étapes de maturation d'un neuroblaste. Après avoir été générés dans la ZSV, les neuroblastes vont migrer en formant des chaînes compactes dans le CMR, soit 5 mm dans l'environnement non permissif qu'est le cerveau adulte. Une fois le BO rejoint, les neuroblastes vont se détacher les uns des autres et commencer leur migration individuelle dans la couche granulaire afin de s'y intégrer ou de rejoindre la couche glomérulaire. 10 jours après avoir été générées, les cellules vont commencer leur maturation qui se poursuivra pendant quelques semaines. L'étape de maturation, particulièrement du jour 14 à 28 lors de la formation des synapses, sera critique dans la survie des nouveaux neurones (Sakamoto 2014). cc, corpus callosum ; Ctx, Cortex ; DG, Dentate Gyrus ; GCL, Granule Cell Layer ; OB, Olfactory Bulbs ; RMS, Rostral Migratory Stream ; SVZ, Subventricular zone. (B) Cette coupe coronale de BO colorée en crésyl violet présente l'organisation du BO. (C) Schéma de l'organisation des cellules et connexions dans le BO. (B-C) Le BO est composé de cellules excitatrices, les cellules mitrales et tufted qui vont projeter leur axone dans le cortex olfactif, et de neurones inhibiteurs, ou interneurons, qui vont moduler l'activité des neurones excitateurs. On notera que la proportion de neurones inhibiteurs est beaucoup plus importante dans cette région du cerveau, suggérant un rôle prépondérant des interneurons dans la représentation olfactive (Sakamoto 2014). Les neurones inhibiteurs appartiennent à différentes catégories (détails dans la Figure 32) et on distingue notamment les cellules périglomérulaires dans la zone glomérulaire et les cellules granulaires dans la zone granulaire. Les cellules granulaires sont les interneurons principalement produits durant la neurogenèse adulte. A gauche, dans la partie la plus externe, les nerfs olfactifs, en provenance de l'épithélium olfactif du nez, vont contacter les dendrites des neurones excitateurs dans les glomérules. Les neurones olfactifs exprimant un même récepteur olfactif projettent tous dans le même glomérule. En allant vers l'intérieur du BO, on trouve les corps cellulaires des neurones tufted dans la couche plexiforme externe et ceux des cellules mitrales dans la couche des cellules mitrales. L'intérieur du BO est composé de la couche granulaire. A l'entrée du BO, dans sa partie postérieure, on peut observer le CMR, structure dense d'où les nouveaux neurones vont se détacher pour remplacer les interneurons dans les couches glomérulaire (les cellules périglomérulaires) et granulaire (cellules granulaires). abGC, adult born Granule Cell ; abPGC, adult born PeriGlomerular Cell ; dSAC, deep Short Axon Cell ; EPL, External Plexiform Layer ; ETC, External Tufted Cell ; GC, Granule cell ; GCL, Granule Cell Layer ; GL, Glomerular Layer ; MC, Mitral Cell ; MCL, Mitral Cell Layer ; ONL, Olfactory Nerve Layer ; PGC, PeriGlomerular Cell ; sSAC, superficial Short Axon Cell ; SVZ, Subventricular zone ; TC, Tufted Cell. Illustrations de Whitman & Greer (2009) (A) et Lepousez *et al.* (2013) (B-C).

### ***III- 1.c Fonctions de la neurogenèse adulte dans le bulbe olfactif***

La neurogenèse dans le BO semble impliquée dans le comportement olfactif et différentes méthodes d'ablation de la neurogenèse ont fourni des résultats sur le rôle des nouveaux neurones générés (Tableau 2). Il existe deux paradigmes expérimentaux pour les capacités olfactives des rongeurs. Un premier paradigme dit d'habituation/déshabituaiton consiste à mesurer le temps passé par l'animal à renifler une odeur présentée. L'animal est exposé à une odeur A de manière répétée puis à une nouvelle odeur ou à la même avec une concentration différente (B). Plus l'animal est exposé à l'odeur A, moins il passera de temps à la renifler, c'est l'habituation. Lorsque l'on présente l'odeur B, l'animal passera alors plus de temps à la renifler, c'est la déshabituaiton. Ce test peut également permettre de mesurer la mémoire olfactive à court terme en faisant varier l'intervalle entre deux sessions d'exposition aux odeurs. Un second paradigme est l'étude de l'apprentissage associatif où l'animal apprend à associer une odeur à une récompense. Il existe deux tests permettant d'évaluer ce paramètre : on peut mesurer la capacité de l'animal à associer l'odeur présentée à une récompense ou sa capacité à discriminer cette odeur, associée à une récompense, d'une autre odeur. Selon la méthode d'ablation et le test de comportement utilisé, les résultats obtenus peuvent être contradictoires (Tableau 2) (Sakamoto *et al.* 2014).

## Tableau 2 : Résultats contradictoires sur le rôle de la neurogenèse dans le BO

Données et illustration de Sakamoto *et al.* (2014).

Expérience	Méthode d'ablation	Résultats obtenus
<p>Habituation-Déshabitude</p>  <p>Habituation      Dishabitude</p>	<p>Infusion d'antimitotique dans les ventricules</p>	<p>Diminution de la capacité de discrimination des odeurs et de la mémoire olfactive à court terme</p>
	<p>Souris transgénique présentant une diminution de neurogenèse dans le BO</p>	<p>Perte de la capacité à discriminer les odeurs</p>
	<p>Ablation de la neurogenèse par irradiation (rayon-γ)</p>	<p>Conservation de la capacité de discrimination des odeurs et de la mémoire olfactive à court terme</p>
<p>Apprentissage associatif</p> 	<p>Infusion d'antimitotique dans les ventricules</p>	<p>Apprentissage de la tâche et formation de mémoire à long terme</p>
	<p>Souris transgénique présentant une diminution de neurogenèse dans le BO</p>	<p>Ablation de la tâche et formation de mémoire à long terme</p>
	<p>Ablation génétique de la neurogenèse</p> <p>Ablation de la neurogenèse par irradiation (rayon-γ)</p>	<p>Pas de formation de mémoire olfactive à long terme</p>

Toutefois, il ressort de ces études que la formation de nouveaux interneurons dans le BO adulte est impliquée dans la régulation de la plasticité et de la mémoire. Cette hypothèse est renforcée par une étude utilisant l'optogénétique qui montre que l'activation des nouveaux neurones permet d'accélérer la capacité d'apprentissage dans des tâches de discrimination et d'améliorer la mémoire lors d'une tâche d'apprentissage associatif (Alonso *et al.* 2012). Ainsi, la neurogenèse adulte du BO permet de modifier la mémoire olfactive et la valeur associée à une odeur. Ce processus semble également impliqué dans les comportements d'accouplement et maternel. En plus de ces expériences d'ablation, il a été montré que la déprivation sensorielle entraîne une diminution de la survie des cellules granulaires générées. A l'inverse, on observe une augmentation du nombre de cellules intégrées chez les rongeurs exposés à un environnement enrichi ou lors d'une tâche d'apprentissage olfactive. La neurogenèse adulte dans le BO est donc modulée par l'environnement. L'élimination de neurones coïncide avec la formation de synapses, ce qui suggère que la survie des nouveaux neurones dépend en partie des entrées synaptiques. La neurogenèse peut ainsi être une nouvelle forme de plasticité qui modulera en retour l'activité du réseau déjà en place (Sakamoto *et al.* 2014).



### ***III- 1.d La neurogenèse adulte au cours de l'évolution***

#### **La neurogenèse adulte chez l'Homme**

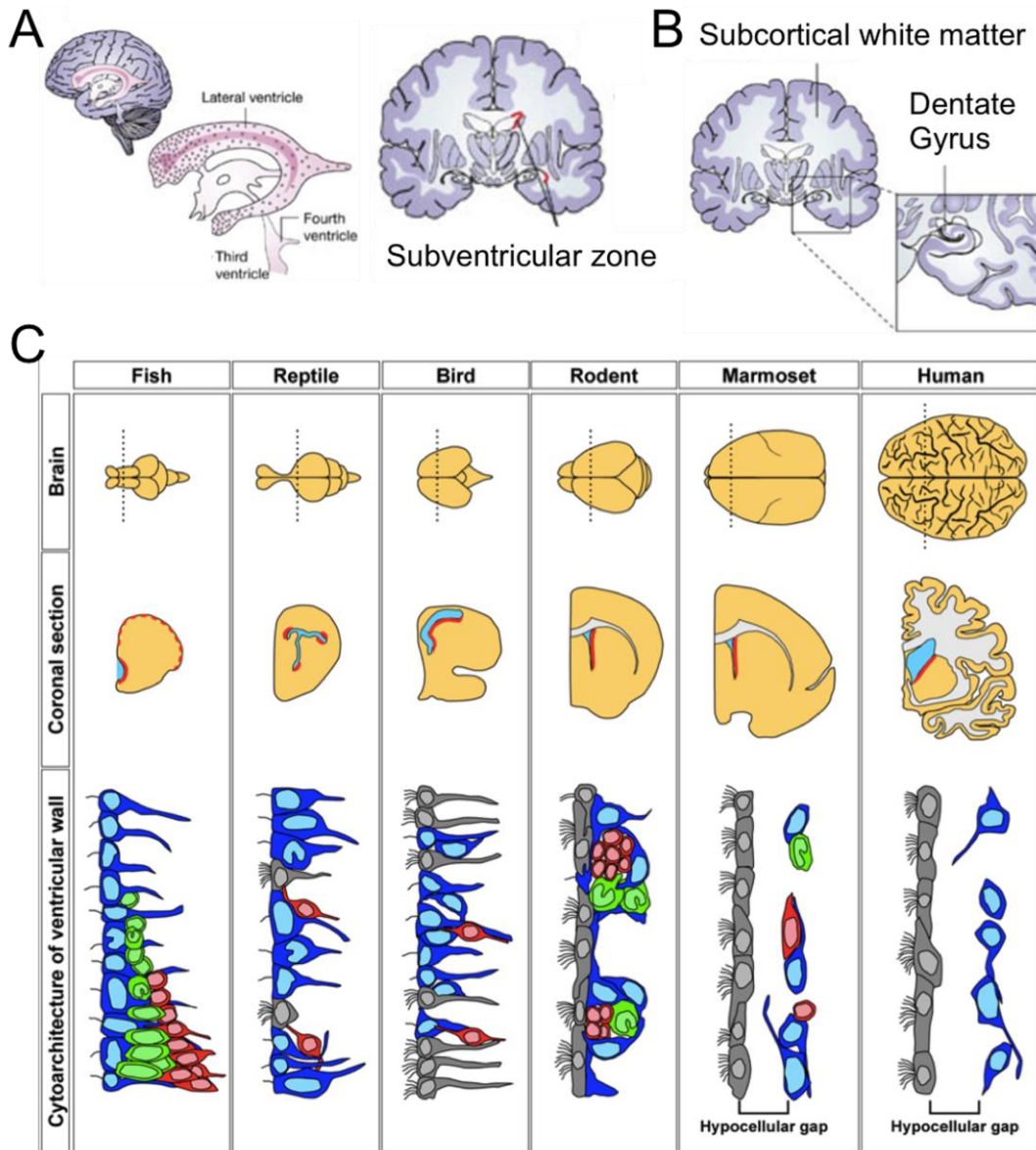
Chez l'Homme (Figure 21A, B), la neurogenèse adulte dans l'hippocampe (Annexe I) a été prouvée et on estime que 700 nouveaux neurones sont ajoutés chaque jour dans le gyrus dentelé d'un Homme avec un renouvellement de 1,75% par an, similaire à ce qui est observé chez les rongeurs (Eriksson *et al.* 1998; Spalding *et al.* 2013). Il semble donc que ce processus de neurogenèse dans l'hippocampe a été conservé durant l'évolution des mammifères afin de permettre une meilleure adaptation à l'environnement en permettant d'améliorer la discrimination de patterns. Il n'en est pas de même pour la ZSV. En effet, une publication par le même groupe de Jonas Frizen en 2012 a conclu que les neurones dans le BO ne sont pas renouvelés chez l'adulte (Bergmann *et al.* 2012). Cette étude venait renforcer une étude décrivant la disparition chez l'adulte d'un corridor de neuroblastes présent durant l'enfance (Sanai *et al.* 2007). De la même manière, une absence d'intégration de nouveaux neurones dans le BO a été décrite, mais on observe la formation de neuroblastes dans le cerveau humain adulte (Wang *et al.* 2011). De plus, il semble que chez l'Homme, la neurogenèse dans la ZSV remplisse une nouvelle fonction. En effet, le groupe de Frizen a montré, toujours avec la même méthode, que de nouveaux neurones étaient générés dans le striatum avec un taux de renouvellement de 2,7% par an (Ernst *et al.* 2014). Cette étude nécessite toujours confirmation, mais il est intéressant d'imaginer qu'une telle neurogenèse pourrait être impliquée dans le développement du contrôle moteur et des capacités cognitives comme la mémoire de travail. Toutefois, une autre étude a montré que les interneurones du striatum étaient générés durant le développement embryonnaire uniquement (Wang *et al.* 2014). Ainsi, si l'hypothèse d'une neurogenèse adulte dans le BO chez l'Homme est rejetée, la question de la production de nouveaux neurones dans le striatum adulte est toujours ouverte.

### Mise en perspective de la neurogenèse adulte

La neurogenèse chez l'adulte n'est pas un phénomène unique au mammifère (Figure 21C). Au contraire, les poissons présentent une neurogenèse continue et soutenue tout au long de la vie. Chez les poissons et certains reptiles, de nouveaux neurones migrent dans diverses régions du cerveau antérieur et notamment dans les BO. Le champ de la neurogenèse s'est principalement développé grâce à la découverte de la production de nouveaux neurones chez l'oiseau, plus particulièrement chez les passeris. La neurogenèse a lieu principalement dans l'hyperstriatum ventral qui est impliqué dans le développement du chant, important dans le comportement d'accouplement, suggérant un rôle central de la neurogenèse adulte dans l'apprentissage et la plasticité cérébrale. On notera que la neurogenèse dans l'hippocampe est apparue chez les mammifères. Chez les oiseaux et reptiles, les nouveaux neurones produits dans le cortex médian, l'homologue du gyrus dentelé des mammifères, proviennent de la zone ventriculaire. Chez le rongeur (souris et rat), modèle le plus étudié, la neurogenèse produit des neurones pour le BO, après migration par le CMR, et est impliquée dans l'olfaction. Il est difficile de conclure sur une organisation générale chez les mammifères. En effet, on observe un écart hypocellulaire, c'est-à-dire une zone dépourvue de corps cellulaire entre le mur ventriculaire et les cellules souches, chez de nombreuses espèces comme le lapin, le mouton, la vache ou encore les primates. Toutefois, si chez l'Homme on observe peu de neuroblastes, de nombreuses espèces de mammifères présentent des chaînes de neuroblastes même si elles présentent un écart hypocellulaire. Un autre élément de disparité est la présence de ventricules olfactifs ouverts, qui prolongent le mur ventriculaire, notamment chez le lapin, le mouton et la vache. Chez la souris et l'Homme, ces ventricules olfactifs se ferment durant le développement et formeront chez la souris le CMR (Paredes, Sorrells *et al.* 2016). Une particularité de la neurogenèse chez l'Homme est la présence, chez l'enfant, d'un courant de migration médian en plus d'un CMR. Les neuroblastes migrent en chaîne vers le cortex préfrontal et pourraient être impliqués dans le développement des capacités cognitives (Sanai *et al.* 2011; Paredes, James *et al.* 2016). Enfin, les travaux sur les primates et l'Homme (notamment la génération d'interneurones dans le striatum) nécessitent confirmation avant de pouvoir effectuer des recherches sur les

implications fonctionnelles de la neurogenèse dans la ZSV (Paredes, Sorrells *et al.* 2016).

Ainsi il semblerait que plus on se rapproche de l'Homme, moins la neurogenèse est soutenue. Une hypothèse étant que l'évolution de la taille du cerveau et le développement d'autre sens tel que la vision à défaut de l'olfaction (en comparaison des rongeurs) ont entraîné des contraintes physiques d'une part, et des modifications des besoins de neurogenèse d'autre part. Toutefois, ces différents modèles d'étude permettent de mieux comprendre ce processus en identifiant des mécanismes communs ou uniques pour chaque espèce (Paredes, Sorrells *et al.* 2016; Sawada & Sawamoto 2013).



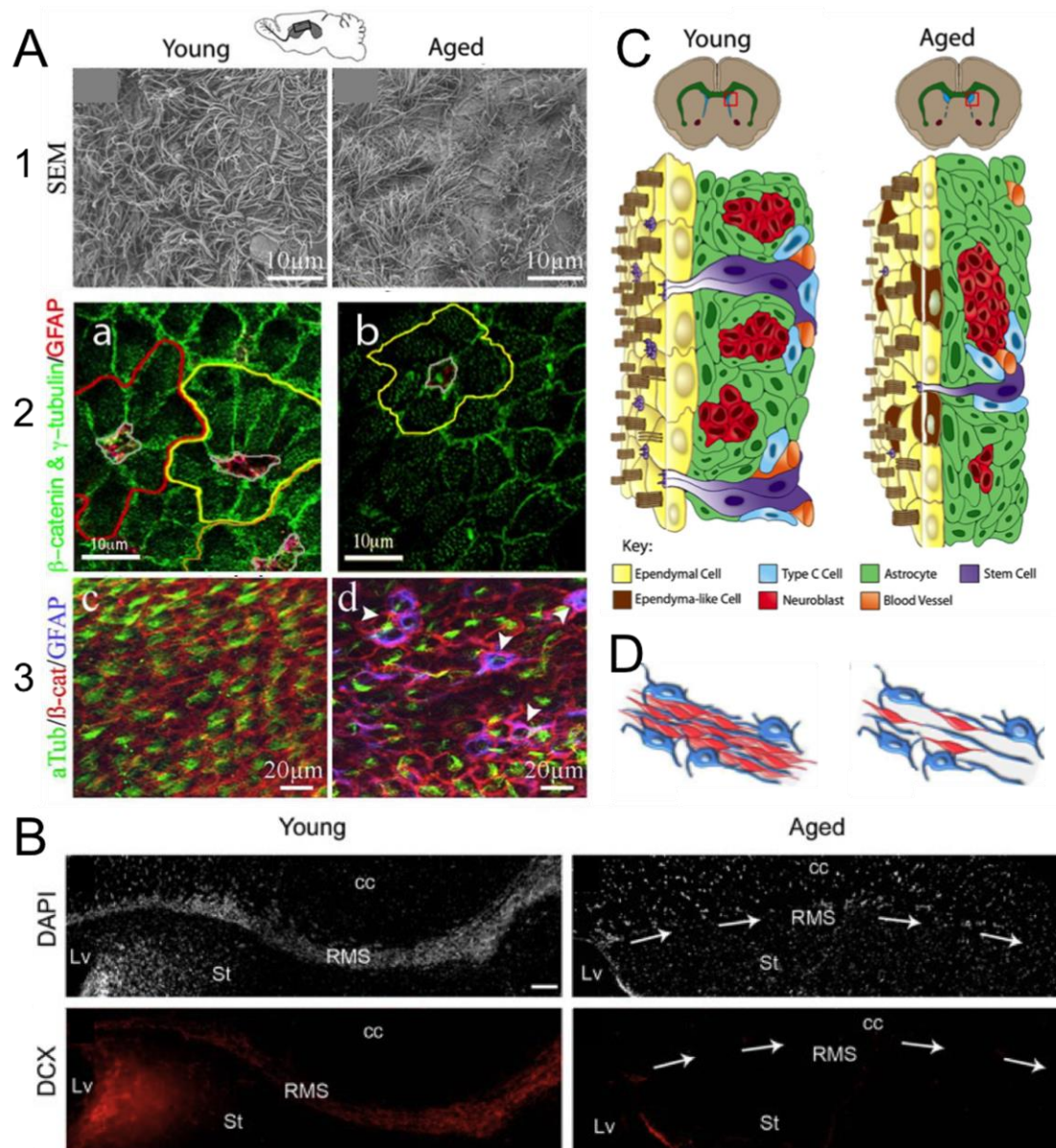
**Figure 21 : La neurogenèse au cours de l'évolution**

(A-B) Schéma de la localisation des zones de neurogenèse dans le cerveau humain. (A) Les cellules souches sont localisées dans la ZSV, le long des ventricules latéraux et (B) dans le gyrus dentelé, comme chez les rongeurs. (C) Schéma représentant la localisation de la zone neurogénique du mur ventriculaire contenant des cellules souches et son organisation au cours de l'évolution. Le panel du haut présente une vue dorsale des cerveaux. Le panel du milieu présente une vue en coupe coronale correspondant aux pointillés dans le panel du haut. En rouge, la localisation de la zone ventriculaire où ont été identifiées les cellules souches. Le panel du bas expose l'organisation du mur ventriculaire, très variable selon les espèces, mais avec les mêmes types cellulaires : les cellules souches (bleu), les progéniteurs intermédiaires (vert), les neuroblastes (rouge) et les cellules épendymaires (gris). Chez les primates adultes, il existe un écart (ou gap) dépourvu de corps cellulaire entre le mur ventriculaire — composé de cellules épendymaires — et les cellules souches. Durant l'enfance, cet écart est rempli de neuroblastes en migration. Illustrations de Dietrich *et al.* (2008) (A-B) et Sawada & Sawamoto (2013) (C).

### ***III- 1.e Déclin de la neurogenèse durant le vieillissement***

Le vieillissement est associé avec plusieurs modifications de la niche et une diminution de la neurogenèse et des capacités de discriminations fines des odeurs chez les rongeurs (Figure 22) (Enwere *et al.* 2004). Le déclin de la neurogenèse commence de manière assez précoce. En effet, on observe une diminution de 39% des progéniteurs de type C et de 54% des neuroblastes dans la ZSV entre 2 et 4 mois chez la souris. Cette diminution des progéniteurs est en accord avec l'observation d'une diminution de la formation de nouveaux neurones durant le vieillissement. La proportion de progéniteurs continue de diminuer progressivement à 6, 9 et 12 mois. Le pool de cellules souches neurales dans la ZSV reste stable, et ce jusqu'à 12 mois et la structure en pinwheel est conservée à 6 mois. En revanche, le pool de cellules souches est diminué chez des souris de 24 mois et la structure en pinwheel est perturbée (Daynac *et al.* 2016). Les cellules souches participent notamment à la réparation de la couche de cellules épendymaires qui se dégrade (Luo *et al.* 2008).

Ainsi, le déclin de neurogenèse observé durant le vieillissement a lieu de manière progressive. Il commence de manière précoce avec une déplétion des progéniteurs en premier lieu, suivi chez les individus plus âgés, d'une diminution du nombre de cellules souches.



**Figure 22 : Modification de la niche chez la souris âgée**

(A1) Une image en microscopie électronique révèle la diminution de cils présents à la surface du ventricule et (A2) des immunomarquages montrent la perte de la structure en pinwheel et la diminution du nombre de processus astrocytaires dans les pinwheels restants, et (A3) l'insertion d'astrocytes, marqués GFAP, dans la couche de cellules épendymaires. (B) Le CMR est également impacté et l'immunomarquage des neuroblastes révèle la perte quasi complète de ces précurseurs. cc, corpus callosum ; Lv, Lateral ventricule ; RMS, Rostral Migratory Stream ; St, Striatum. Barre d'échelle 100  $\mu\text{m}$ . (C) Schéma résumant les changements observés dans la ZSV de souris âgées. Seule la partie dorsale de la ZSV, qui s'étend, présente des cellules en prolifération. On trouve notamment des cellules souches qui s'intègrent (marron) dans la couche de cellules épendymaires préexistante (jaune). On observe également, assez précocement, une diminution des précurseurs (bleu et rouge). A des stades plus tardifs, le pool de cellules souches diminue (violet). (D) Schéma du CMR d'un individu âgé. Le tunnel d'astrocyte semble conservé tandis que les neuroblastes sont rares. Illustrations de Conover & Shook (2011) (A1, A3, C), Luo *et al.* (2008) (A2), Capilla-Gonzalez *et al.* (2013) (B, D).

## **III- 2. La niche de la zone sous-ventriculaire fournit un environnement unique pour la neurogenèse adulte**

### ***III- 2.a Composition et interactions dans la niche de la zone sous-ventriculaire***

#### **Cellules de la niche**

La niche de la ZSV est composée des cellules souches (type B), des progéniteurs (type C et A, ou neuroblastes), de vaisseaux sanguins, des cellules épendymaires, des cellules microgliales, des astrocytes non-souches et d'autres cellules de support ainsi qu'une MEC particulière (Figure 23A) (Jankovski & Sotelo 1996; Shen *et al.* 2008; Doetsch *et al.* 1997). De la même manière, les cellules souches de l'hippocampe reposent dans un environnement complexe (Annexe I).

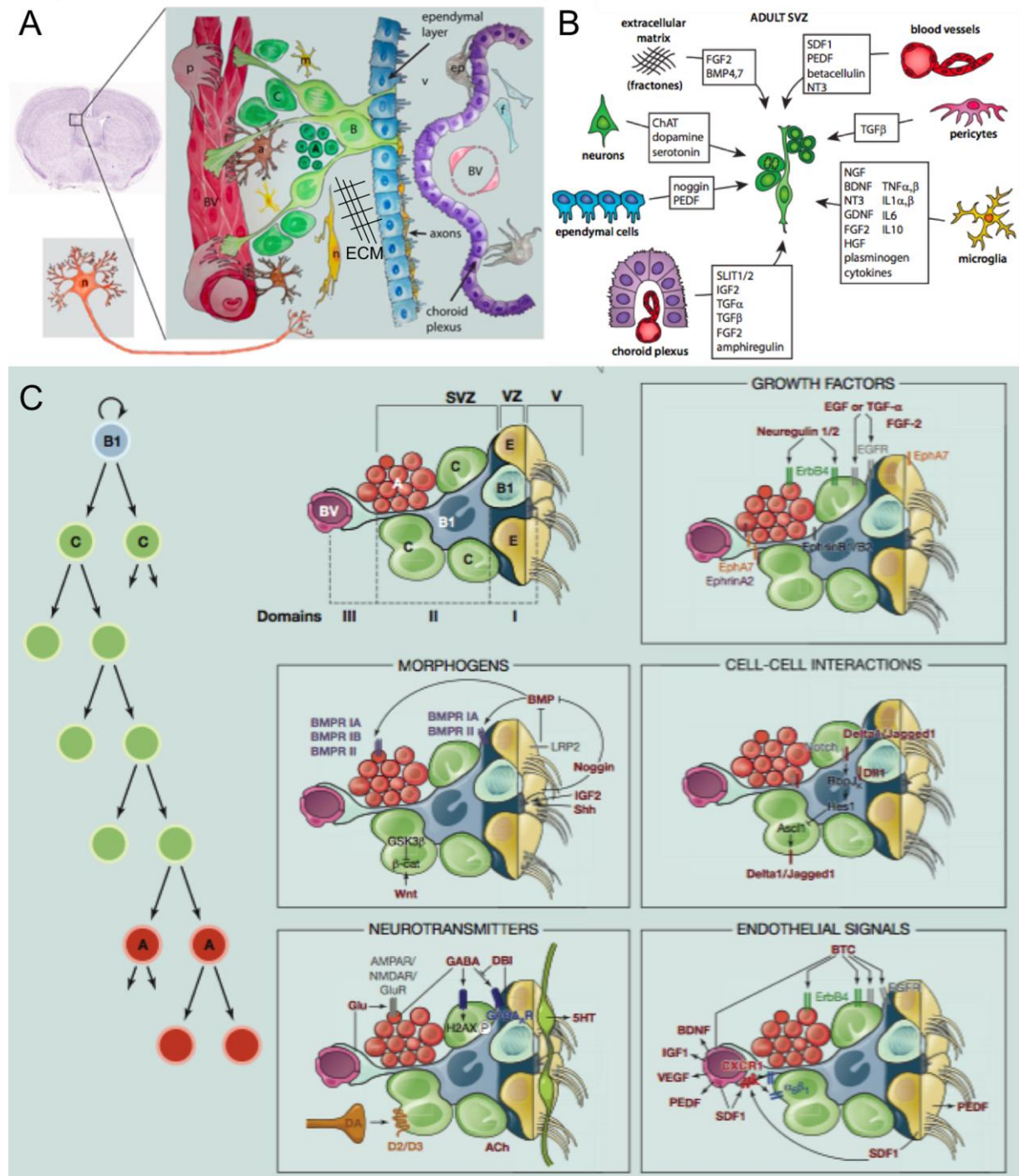
#### **Communication intercellulaire**

Il a été montré que l'ensemble de ces cellules de support sécrète divers facteurs pouvant réguler la neurogenèse (Figure 23B) (Bjornsson *et al.* 2015). Des expériences de culture *in vitro* de ZSV provenant de souris adultes jeunes ou âgées (qui présentent une prolifération atténuée) ont montré que les progéniteurs avaient les mêmes capacités de prolifération. De plus, des expériences de parabiose entre une souris de 15 mois et une souris de 2 mois ont montré une restauration de la neurogenèse et une amélioration des capacités olfactives chez la souris âgée de 15 mois, soulignant davantage l'importance de l'environnement dans la régulation de la neurogenèse adulte (Katsimpardi *et al.* 2014; Silva-Vargas *et al.* 2013). Dans cet environnement, les cellules souches et les progéniteurs interagissent avec la niche par des contacts intercellulaires au niveau membranaire ou bien en recevant des molécules de signalisations telles que des morphogènes, des facteurs de croissance et autres signaux paracrines (Figure 23C) (Bjornsson *et al.* 2015). La ZSV reçoit également des innervations provenant de différentes régions du cerveau. Ainsi, on trouve des axones de neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale qui peuvent moduler la prolifération des cellules B1 et C. La ZSV reçoit également des afférences sérotoninergiques depuis le raphé. Ces neurones envoient des axones le long du mur ventriculaire, du côté du LCS, formant un réseau qui contacte les cellules

épendymaires et les cellules de type B afin de moduler leur prolifération. Un autre acteur éloigné de la ZSV, et qui ne la contacte pas directement cette fois, est l'ensemble des quatre PC. Leur rôle sera décrit plus loin (Partie III- 5, p.110) (Bjornsson *et al.* 2015).

En plus de ces interactions directes avec les cellules souches et les progéniteurs, les cellules de support peuvent interagir entre elles. Il en est de même pour les cellules souches et les progéniteurs qui peuvent communiquer entre eux. On observe ainsi une boucle de régulation depuis des neuroblastes, qui sécrètent du GABA, vers les cellules souches, qui expriment le récepteur GABA<sub>A</sub>, afin d'inhiber leur prolifération (Silva-Vargas *et al.* 2013). La régulation de la neurogenèse est donc complexe et encore le sujet de nombreuses recherches.





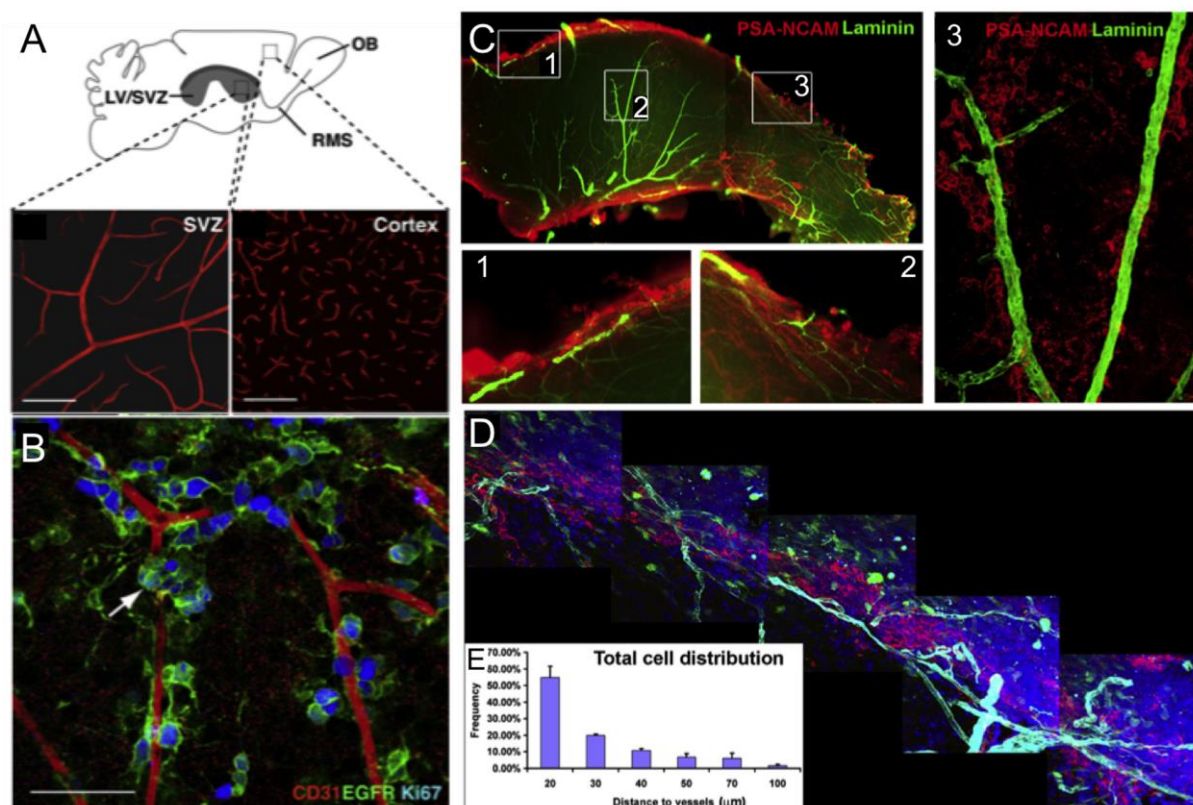
### Figure 23 : Interactions complexes dans la niche neurogénique de la ZSV

(A) Ce schéma de la composition de la niche de la ZSV montre les cellules de support situées dans la ZSV. A, neuroblasts ; a, astrocyte ; B, stem cells ; BV, Blood Vessels ; C, type C progenitors ; ECM, ExtraCellular Matrix ; ep, epiplexus cell ; f, fibroblast ; m, microglia ; n, neurones ; p, pericyte ; v, ventricule. (B) L'ensemble des cellules de support sécrète des signaux régulant le processus de la neurogenèse et la MEC est capable de stocker des facteurs de signalisation qui seront relargués et présentés aux cellules souches et progénitrices. (C) Exemple de signalisation dans la ZSV. Les facteurs de croissance, qui peuvent être stockés dans la MEC, permettent de réguler la prolifération des cellules souches et des progéniteurs ainsi que d'orienter les cellules souches vers un destin cellulaire. Des morphogènes, provenant notamment du LCS comme BMP, vont aussi réguler la prolifération. Les cellules souches et progéniteurs interagissent également par contact cellulaire et ceci pourrait permettre de former des boucles de régulations afin de contrôler le nombre de neuroblastes envoyés vers le BO. Les progéniteurs peuvent également être régulés par des cellules éloignées de la niche comme les neurones qui, par l'intermédiaire de leurs neurotransmetteurs, vont moduler la neurogenèse. Enfin, un exemple de régulation par les cellules de la niche est la sécrétion de facteurs par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins qui, de nouveau, va réguler la prolifération, mais aussi la migration des neuroblastes. Les études de la signalisation de certaines molécules ont pu montrer des résultats opposés, probablement dus au fait que les cellules souches et les progéniteurs possèdent des récepteurs en commun. Ainsi une méthode d'étude peut impacter un type de progéniteurs tandis qu'une autre méthode mettra en avant un mécanisme sur un autre type de progéniteurs. Illustrations de Bjornsson *et al.* (2015) (A-B) Tong & Alvarez-Buylla (2014) (C).

### **Le réseau vasculaire est un acteur important de la niche de la zone sous-ventriculaire**

Le réseau vasculaire de la ZSV semble unique à cette région avec une organisation planaire tout le long du mur ventriculaire. Les cellules souches et les progéniteurs de type C se divisent au niveau de sites vasculaires dépourvus de péricytes et de pieds astrocytaires. Les vaisseaux semblent également importants pour la migration et on observe des vaisseaux sanguins le long, et même à l'intérieur, des chaînes de neuroblastes, principalement dans la partie dorsale de la ZSV qui présente aussi une forte densité de neuroblastes (Figure 24) (Doetsch & Alvarez-Buylla 1996; Tavazoie *et al.* 2008; Shen *et al.* 2008). L'expérience de parabiose citée plus haut a également permis de montrer un remodelage du réseau vasculaire suggérant davantage une régulation négative de la neurogenèse par sa niche durant le vieillissement (Katsimpardi *et al.* 2014).

Si les vaisseaux de cette région sont dépourvus de pieds astrocytaires, nous verrons plus tard qu'il existe tout de même des astrocytes, non-souches, associés aux vaisseaux sanguins dans la ZSV (Partie III- 4.b, p.104). Toutefois, aucune étude n'a démontré le rôle d'une interaction entre astrocytes non-souches et vaisseaux sanguins dans la ZSV.



### Figure 24 : Le réseau vasculaire de la ZSV semble être un acteur primordial de la neurogenèse adulte

(A) Le schéma indique les zones prises en photo suite à un immunomarquage des vaisseaux sanguins. On observe alors une organisation planaire des vaisseaux sanguins le long de la ZSV, tandis que dans le cortex les capillaires sanguins présentent une organisation plus complexe et des branchements orientés de manière aléatoire. Barre d'échelle 100 µm. (B) Les cellules en division sont marquées en bleu. Les progéniteurs de type C et les cellules souches activées expriment EGFR (vert), sont associés aux vaisseaux sanguins et forment parfois des clusters (flèche). Barre d'échelle 50 µm. (C) L'immunomarquage de la laminine sur ZSV entière (partie antérieure à gauche et dorsale en haut) révèle les vaisseaux sanguins et PSA-NCAM, les neuroblastes. (C1-3) Les agrandissements révèlent que les chaînes de neuroblastes sont alignées le long des vaisseaux sanguins. Ceci est observé principalement dans les régions antérieure (1) et dorsale (2). (D) Immunomarquage dans la région dorsale de la ZSV des astrocytes (GFAP, vert), des neuroblastes (PSA-NCAM, rouge) et des vaisseaux (laminine, cyan). Les noyaux sont marqués en bleu. On peut remarquer des vaisseaux le long et dans les chaînes de neuroblastes, mais aussi des astrocytes au-dessus des chaînes. (E) La quantification de la distance des cellules de la ZSV par rapport aux vaisseaux sanguins montre l'association avec plus de 50% des cellules à moins de 20 µm des vaisseaux. Illustrations de Tavazoie *et al.* (2008) (A-B) et Shen *et al.* (2008) (C-E).

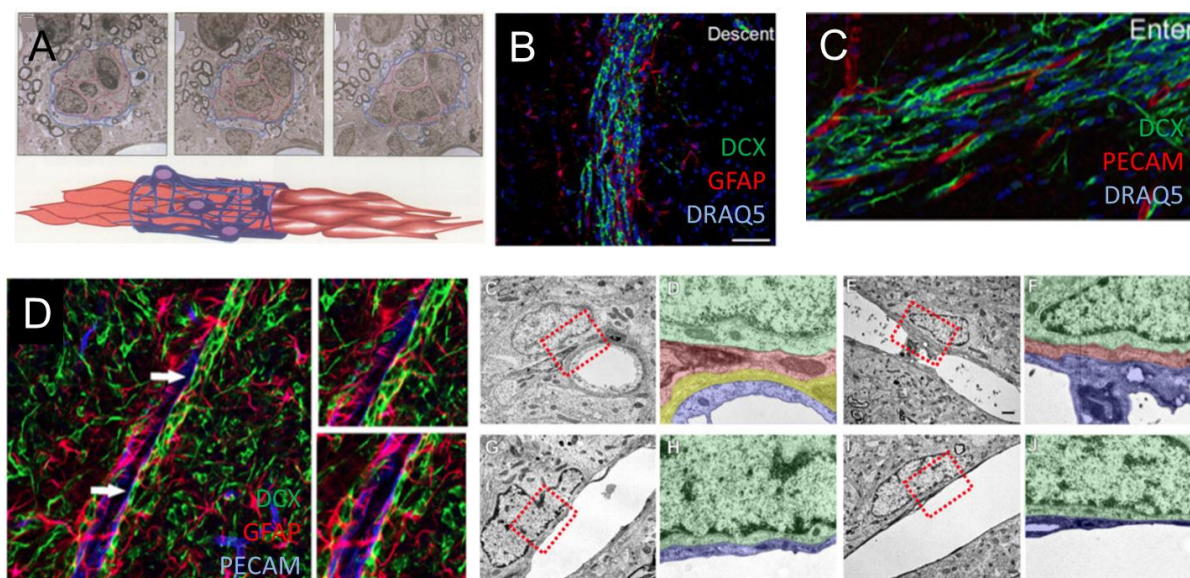
### ***III- 2.b Composition et interactions dans le courant de migration rostral***

#### **Composition cellulaire du courant de migration rostral**

Dans le CMR, les neuroblastes interagissent de nouveau avec les vaisseaux sanguins et les astrocytes. Ces derniers forment un tube entourant les chaînes de neuroblastes et présentent des morphologies uniques au réseau ZSV-CMR-BO (Figure 25A, B) (Lois *et al.* 1996). En effet, ces astrocytes présentent une forme allongée, avec des processus orientés parallèlement au CMR. Les astrocytes qui sont en dehors du CMR ne présentent pas cette morphologie particulière et adoptent un arrangement typique des astrocytes avec un corps cellulaire rond et des processus dans toutes les directions. Les astrocytes associés aux neuroblastes en migration semblent donc spécialisés et s'intègrent de manière parallèle entre les chaînes de neuroblastes en migration (Jankovski & Sotelo 1996).

Les vaisseaux sanguins présentent, de nouveau, une organisation unique. Ils sont orientés en parallèle des neuroblastes en migration (Figure 25C). Dans le cervelet, où il n'y a pas de neuroblastes, les vaisseaux sanguins ne présentent pas d'orientation particulière (Whitman *et al.* 2009; Snapyan *et al.* 2009).

De plus, ces trois types cellulaires se contactent, suggérant une interaction complexe et les vaisseaux sanguins et les astrocytes pourraient former une route de migration pour les neuroblastes jusqu'au BO (Figure 25D) (Whitman *et al.* 2009).



**Figure 25 : Association des cellules de support et des neuroblastes**

(A) Description originale d'un tube astrocytaire autour des neuroblastes du CMR. Les neuroblastes sont colorés en rouge et les astrocytes en bleu sur des images de microscopie électronique et le schéma illustrant la découverte. (B) Les neuroblastes (vert) sont associés à des astrocytes (rouge). La densité de processus astrocytaires marqués GFAP est plus importante dans le réseau que dans les régions adjacentes. Cette association préférentielle des astrocytes dans la ZSV et le CMR renforce l'hypothèse d'un rôle des astrocytes dans la migration des neuroblastes. Les noyaux sont marqués en bleu. Barre d'échelle 50  $\mu$ m. (C) Les vaisseaux sanguins (rouge) sont orientés en parallèle des chaînes de neuroblastes (vert) tout le long du réseau ZSV-CMR-BO. Les noyaux sont marqués en bleu. (D) L'immunomarquage des astrocytes (rouge), des vaisseaux sanguins (bleu) et des neuroblastes (vert) montre les neuroblastes migrant le long des vaisseaux sanguins avec des processus astrocytaires dans les chaînes de migration et apposés sur les vaisseaux sanguins. Des images en microscopie électronique montrent les différentes configurations existantes pour l'interaction entre ces cellules. On observe des neuroblastes (vert) séparés des vaisseaux sanguins (bleu) par des astrocytes (rouge), avec ou sans péricytes (jaune), mais aussi des contacts directs entre neuroblastes et vaisseaux sanguins. Illustrations de Lois *et al.* (1996) (A) et Whitman *et al.* (2009) (B-D).

### **Éléments suggérant une interaction entre astrocytes et neuroblastes**

Si ces études montrent des associations physiques entre ces cellules, il est difficile de prouver une interaction directe. De plus, une étude a montré que les astrocytes ne sont pas requis pour la formation des chaînes de neuroblastes. En effet, *in vitro*, les neuroblastes issus de la ZSV adulte forment des chaînes spontanément, tandis que les neuroblastes issus de la zone ventriculaire du cortex en développement ne forment pas de chaînes. Cette propriété semble donc acquise par ces cellules et ne semble pas requérir de cellule de support (Wichterle *et al.* 1997). On peut toutefois supposer que dans l'environnement complexe du cerveau, les cellules de support jouent un rôle primordial pour faciliter la migration des neuroblastes jusqu'au BO. De manière intéressante, le tube astrocytaire se forme en parallèle de la mise en place du CMR durant les trois premières semaines postnatales de la souris. En effet, on observe une augmentation du marquage astrocytaire GFAP autour des premiers neuroblastes qui transite dans le CMR (P17). Le marquage GFAP forme ensuite des processus dans le CMR, en concomitance avec la formation des chaînes de neuroblastes (P25) suggérant une interaction entre ces populations dans la formation du CMR (Peretto *et al.* 2005). *In vitro*, la mise en culture d'astrocytes favorise la migration des neuroblastes hors d'un explant de ZSV, renforçant l'hypothèse d'un rôle actif des astrocytes dans la migration des neuroblastes (Mason *et al.* 2001). Un exemple de possible interaction provient d'études électrophysiologiques montrant que le GABA régule la vitesse de migration des neuroblastes. Or les neuroblastes sécrètent du GABA et les astrocytes du CMR expriment le récepteur GABA<sub>A</sub> ainsi que des transporteurs suggérant une interaction de ces deux populations dans la régulation de la vitesse de migration des neuroblastes (Bolteus *et al.* 2005). Une autre possibilité d'interaction impliquant les neurotransmetteurs est un potentiel relargage de glutamate par les astrocytes afin de moduler les propriétés des neuroblastes. Ces derniers expriment divers récepteurs au glutamate comme le récepteur au kainate, qui peut moduler la vitesse de migration des neuroblastes ou des récepteurs mGluR5 qui ont été impliqués dans la prolifération des neuroblastes. De nouveau, le rôle direct des astrocytes reste à prouver (Platel & Bordey 2016).

### ***III- 2.c L'étude de la neurogenèse adulte au niveau cellulaire requiert l'utilisation de marqueurs***

L'étude de la neurogenèse au niveau cellulaire requiert l'utilisation de marqueurs spécifiques des sous-types cellulaires impliqués. Toutefois, il faut souvent combiner différents marqueurs afin de définir de manière certaine la population observée (Tableau 3). Il est parfois difficile d'étudier spécifiquement un sous-type cellulaire de la niche étant donnée la redondance des marqueurs existants. Ainsi, discriminer entre cellules souches et cellules épendymaires se fait le plus souvent sur des critères de localisation spatiale avec les cellules épendymaires qui forment une couche longiligne le long du ventricule. La discrimination entre cellules souches et astrocytes nécessite l'utilisation de la microscopie électronique, ou bien l'observation de la localisation du corps cellulaire, et éventuellement un marquage CD133 pour marquer le cil des cellules souches (Doetsch *et al.* 1997; Shen *et al.* 2008; Codega *et al.* 2014). De plus, il n'est pas encore possible de discriminer différentes populations astrocytaires par des marqueurs spécifiques (Partie III- 4, p.103) (Bayraktar *et al.* 2015). D'autres types cellulaires sont beaucoup plus aisés à identifier comme les neuroblastes ou les cellules microgliales.

#### **Tableau 3 : Exemples de marqueurs pour l'étude de la neurogenèse adulte**

(Mamber *et al.* 2010; Ming & H. Song 2011; Codega *et al.* 2014)

<b>Catégorie</b>	<b>Type cellulaire</b>	<b>Marqueurs</b>
Progéniteurs	Cellules souches	GFAP, Id1 high, Nestin, Vimentin, CD133
	Progéniteurs de type C	Nestin, EGFR, Dlx2, Mash-1, Ki67/Mcm2/PCNA (prolifération)
	Neuroblastes	Nestin, DCX, CD24, PSA-NCAM, Tuj-1
Cellules de support	Cellules épendymaires	GFAP (-), Vimentin, S100 $\beta$ , CD24, Nestin, CD133
	Astrocytes	GFAP, S100 $\beta$ , Nestin
	Microglie	Iba-1



### **III- 3. La matrice extracellulaire est le composant non-cellulaire de la niche**

#### ***III- 3.a La matrice extracellulaire dans le cerveau et ses effecteurs***

Le milieu extracellulaire représente 20% du cerveau adulte et est composé de la MEC et du liquide interstitiel. La MEC est structurée, et sa composition et sa structure diffèrent selon les régions. La MEC contribue donc à l'hétérogénéité du cerveau et elle participe à la signalisation intercellulaire. L'ensemble des cellules du cerveau participe à la formation de la MEC et certaines molécules sont exprimées spécifiquement par un type ou sous-type cellulaire (Wiese 2012; Theocharidis *et al.* 2014).

#### **Principales molécules de la matrice extracellulaire dans le cerveau**

On distingue différentes classes de molécules composant la MEC.

Les glycoprotéines sont des protéines possédant un ou plusieurs groupements oligosaccharides (répétition de divers groupements saccharides) liés de manière covalente au corps protéique. La laminine et la fibronectine, des molécules bien connues de la MEC, sont des glycoprotéines, et sont particulièrement enrichies dans la MEC du cerveau. Le collagène est également une glycoprotéine, mais considéré parfois comme une protéine fibrillaire, conférant des propriétés de résistance au tissu, et le cerveau est plutôt dépourvu de cette protéine.

Une autre classe de molécules de la MEC, enrichie dans le cerveau, sont les protéoglycanes qui regroupent les protéines possédant au moins une chaîne de GAG (répétitions de dimères de saccharides sulfatés) liée de manière covalente. Les différents types de GAG (en fonction du dimère répété) permettent de classer les protéoglycanes. Il existe notamment les chondroïtines sulfates et les héparanes sulfates. Les protéoglycanes peuvent également posséder des carbohydrates (ou saccharides). Il existe de nombreux types de protéoglycanes qui diffèrent selon leur corps protéique, leurs GAG et leurs différents motifs de sulfatation et les carbohydrates associés au corps protéique. Ces molécules entrent dans la composition de la membrane plasmique ou sont sécrétées dans la MEC. De nombreuses protéoglycanes sont exprimées dans le système nerveux central et

peuvent moduler la neurogenèse notamment en créant des clusters de récepteurs ou en stockant des molécules de signalisation comme les morphogènes.

En plus des molécules avec un corps protéique, la MEC contient de l'acide hyaluronique qui est un GAG non sulfaté.

Toutes ces molécules vont interagir et se lier entre elles pour créer la structure de la MEC et participer à la signalisation (Faissner & Reinhard 2015; Wiese 2012).

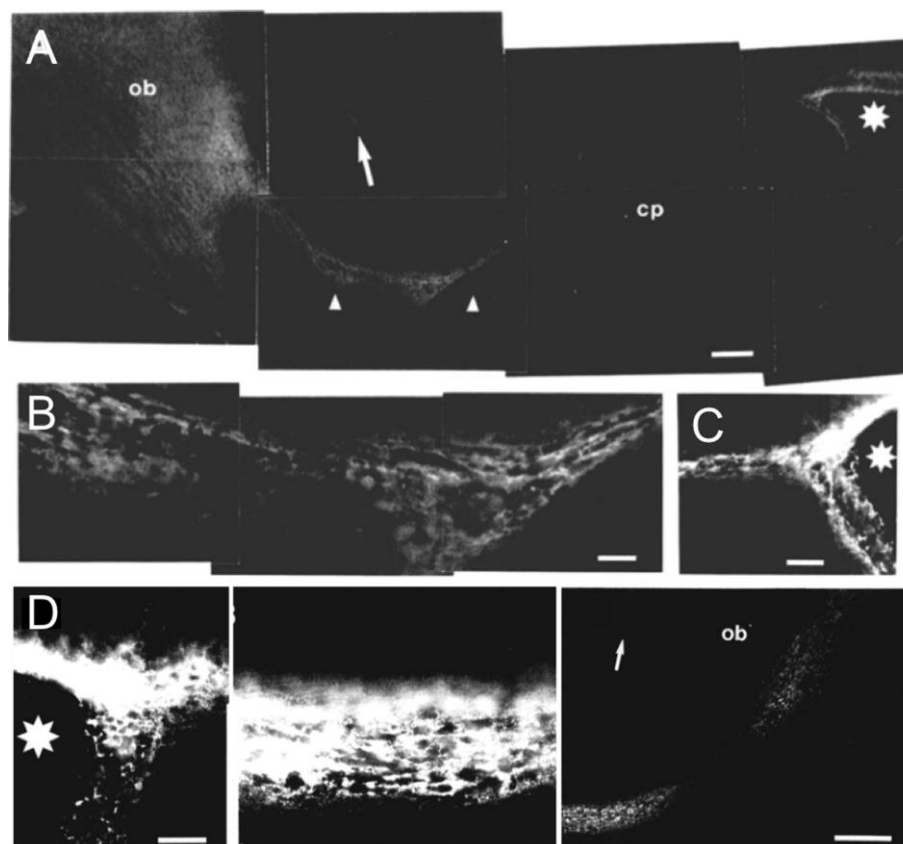
### **La matrice extracellulaire confère un support physique et participe activement à la signalisation dans la niche**

Une fonction commune aux différentes MEC est de servir de support, car les cellules possèdent des protéines extracellulaires qui s'ancrent dans la MEC. Le terme de molécule d'adhésion est attribué aux molécules qui vont permettre l'ancrage des cellules à la MEC ou entre elles. Ainsi, cette classe regroupe, entre autres, des protéoglycanes et des glycoprotéines, notamment les intégrines, se trouvant dans la membrane plasmique. Une autre fonction commune est de former une barrière qui limite la diffusion des molécules. La MEC va également stocker des molécules de signalisation. Cette dernière fonction se révèle être en réalité un important facteur d'hétérogénéité. En effet, selon la composition de la MEC, les facteurs stockés seront différents. Ainsi les cellules n'auront donc pas à disposition les mêmes molécules de signalisation. La MEC contribue ainsi à la prolifération, la migration et la différenciation des cellules souches durant la neurogenèse embryonnaire et adulte (Dityatev *et al.* 2010). Ces rôles de signalisation mettent en jeu la diversité et la distribution spécifique des molécules constituant la MEC qui permettent de reconnaître spécifiquement certaines molécules extracellulaires qui seront présentées à ce sous-type cellulaire. De plus, la MEC peut elle-même réguler la signalisation en interagissant avec des récepteurs qui seront exprimés différemment dans les régions du cerveau et notamment dans la ZSV et le CMR (Annexe J). La complexité de ces signaux et de leurs interactions est encore augmentée par la présence d'une activité protéolytique dans la MEC due notamment aux métalloprotéases et à leurs inhibiteurs (Annexe K) (Wojcik-Stanaszek *et al.* 2011).

### ***III- 3.b La matrice extracellulaire de la zone sous-ventriculaire présente des caractéristiques uniques***

#### **Certaines molécules sont présentes exclusivement dans la zone sous-ventriculaire**

La MEC de la ZSV possède une composition bien particulière et unique comparée aux régions dépourvues de neurogenèse adulte. Elle contient de nombreuses glycoprotéines telles que la laminine (Figure 24C) et la Tnc (Figure 26) ainsi que des protéoglycanes à chondroïtines sulfate, comme DSD1-PG, et des protéoglycanes à héparanes sulfates bien que leur nature exacte reste à définir (Thomas *et al.* 1996; Faissner & Reinhard 2015).

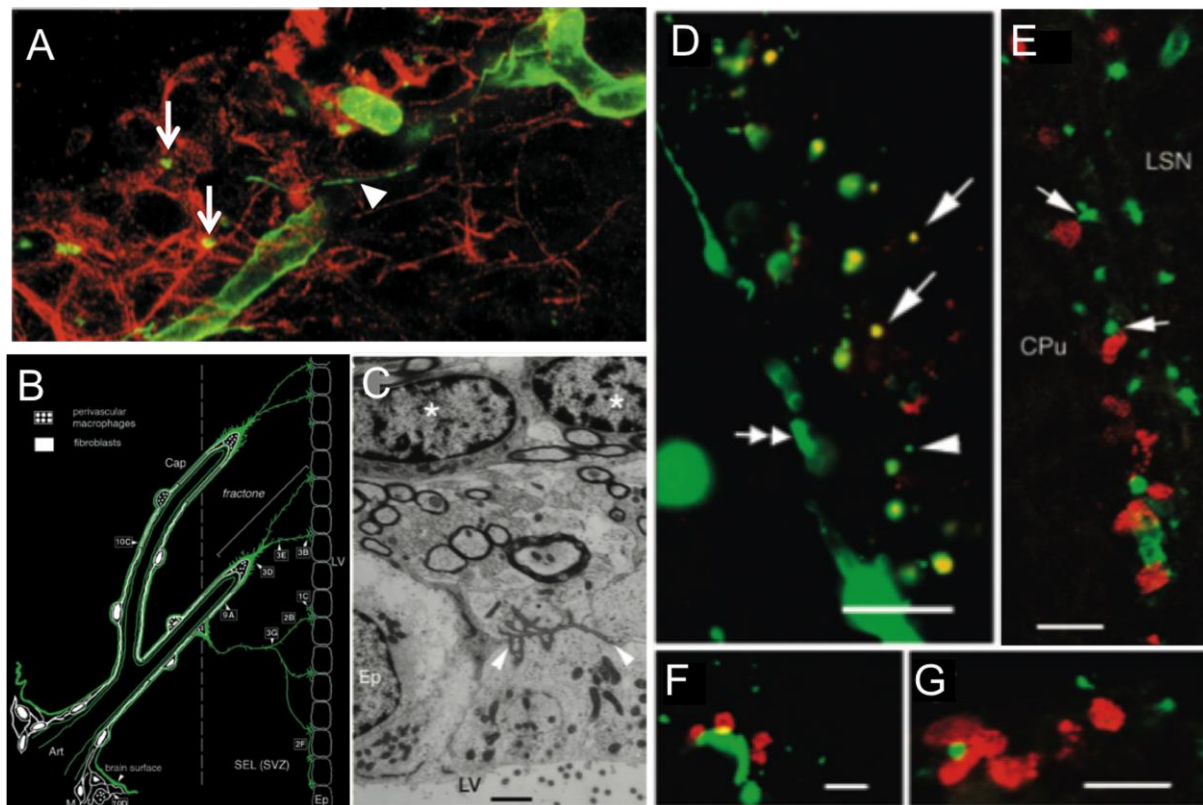


**Figure 26 : L'expression de Tnc et de protéoglycanes à chondroïtines sulfates est restreinte au réseau ZSV-CMR-BO**

(A) L'immunomarquage de la Tnc sur coupe sagittale montre la restriction de son expression dans le cerveau adulte. On note une expression diffuse dans le BO. La flèche indique la jonction entre le cerveau antérieur et le BO (à gauche). cp, caudate putamen ; ob, olfactory bulb. Barre d'échelle 250  $\mu\text{m}$ . (B) Agrandissement de la région entre les pointes de flèche en (A). On observe l'expression intense de Tnc qui semble extracellulaire et entourer des cellules. Barre d'échelle 50  $\mu\text{m}$ . (C) Région de la ZSV d'un autre animal, indiqué par un astérisque en (A). De nouveau, l'expression de la Tnc est extracellulaire et entoure des composants cellulaires. Barre d'échelle 50  $\mu\text{m}$ . (D) L'immunomarquage de protéoglycanes à chondroïtines sulfates dans la ZSV, le CMR et dans le BO (de gauche à droite). Ce marquage semble également extracellulaire et autour de cellules. La flèche indique la jonction entre le cerveau antérieur et le BO (à droite). Barres d'échelle 50  $\mu\text{m}$  (A-B) et 250  $\mu\text{m}$  (C-D). ob, olfactory bulb. Illustrations de Thomas *et al.* (1996).

### **La matrice extracellulaire contient des microdomaines uniques**

La MEC de la ZSV possède un caractère unique, car on observe des superstructures appelées fractones composées de glycoprotéines comme les laminines, le collagène IV et la nidogen et de protéoglycanes à héparanes sulfates (Figure 27) (Mercier *et al.* 2002). Certains protéoglycans à héparanes sulfates (protéoglycanes à héparanes sulfates *N*-Sulfatés) sont d'ailleurs exclusivement observés au sein des fractones. Les cellules souches et les progéniteurs contactent ces fractones et on observe que les cellules prolifèrent le plus souvent près de ces fractones. De plus, les cellules en division sont davantage associées aux fractones qu'aux vaisseaux sanguins. Ceci pourrait être dû à un relargage du FGF2 stocké qui s'associe préférentiellement aux fractones (Figure 27) (Kerever *et al.* 2007; Douet *et al.* 2013). Cette étude de liaison du FGF2 aux fractones a également permis de montrer que les molécules du LCS sont capables de pénétrer dans le parenchyme afin de réguler la neurogenèse sans nécessairement passer par les cellules souches, qui sont les seuls progéniteurs à contacter directement le LCS.



**Figure 27: Organisation et composition des fractones dans la ZSV**

(A) Observation originale des fractones. Le marquage de la laminine (vert) est associé aux vaisseaux sanguins, mais on observe également des points (flèches), constituant les fractones, et des fins processus connectés aux capillaires principaux (pointe de flèche). Le marquage Vimentin (rouge) des cellules épendymaires permet de visualiser la limite du ventricule en haut à gauche. Echelle : 80  $\mu\text{m}$  de large. (B) Schéma de la relation des fractones avec les vaisseaux sanguins, fibroblastes et macrophages périvasculaires d'après des images de microscopie confocale. Les fractones sont des projections de la lame basale des capillaires dans la ZSV. (C) Ultrastructure du mur du corps calleux présentant des cellules post-mitotiques (astérisques) et d'un fractone (entre les pointes de flèche). Barre d'échelle 2  $\mu\text{m}$ . (D) Après infusion dans le LCS de FGF2, on retrouve ce facteur (rouge) associé aux fractones, marqués par la laminine (vert). Barre d'échelle 50  $\mu\text{m}$ . (E-G) Les cellules en division (rouge) sont associées aux fractones marqués par (E) les protéoglycanes à héparanes sulfates N-sulfatés (vert) ou (F-G) la laminine. (D) On observe des clusters de cellules en division près des capillaires et (F) des fractones. Barres d'échelle (E) 15  $\mu\text{m}$  et (F-G) 2  $\mu\text{m}$ . Art, artery ; Cap, Capillary ; CC, Corpus Callosum ; CPu, Caudate Putamen ; Ep, Ependyma ; LV, Lateral Ventricle ; LSN, Lateral Septal Nuclei ; M, meninges ; SEL, SubEpendymal Layer. Illustrations de Mercier *et al.* (2002) (A, B, D) et Kerever *et al.* (2007) (C, E-K).

### **La signalisation nécessite une spécificité d'interaction**

La signalisation intercellulaire nécessite une MEC particulière afin de recevoir les molécules de signalisation extracellulaire comme les facteurs de croissance qui régulent la prolifération. Ainsi, la MEC de la ZSV permet de capturer et parfois stocker des molécules de signalisation comme les BMP ou FGF qui réguleront ensuite le processus de neurogenèse. Au niveau moléculaire, les motifs de sulfatation des protéoglycanes permettent de capturer spécifiquement certains facteurs (Douet *et al.* 2013; Mercier & Douet 2014; Kerever *et al.* 2007). De la même manière, la signalisation par les molécules de guidage est modulée par les protéoglycanes (Dityatev *et al.* 2010; de Wit & Verhaagen 2007).

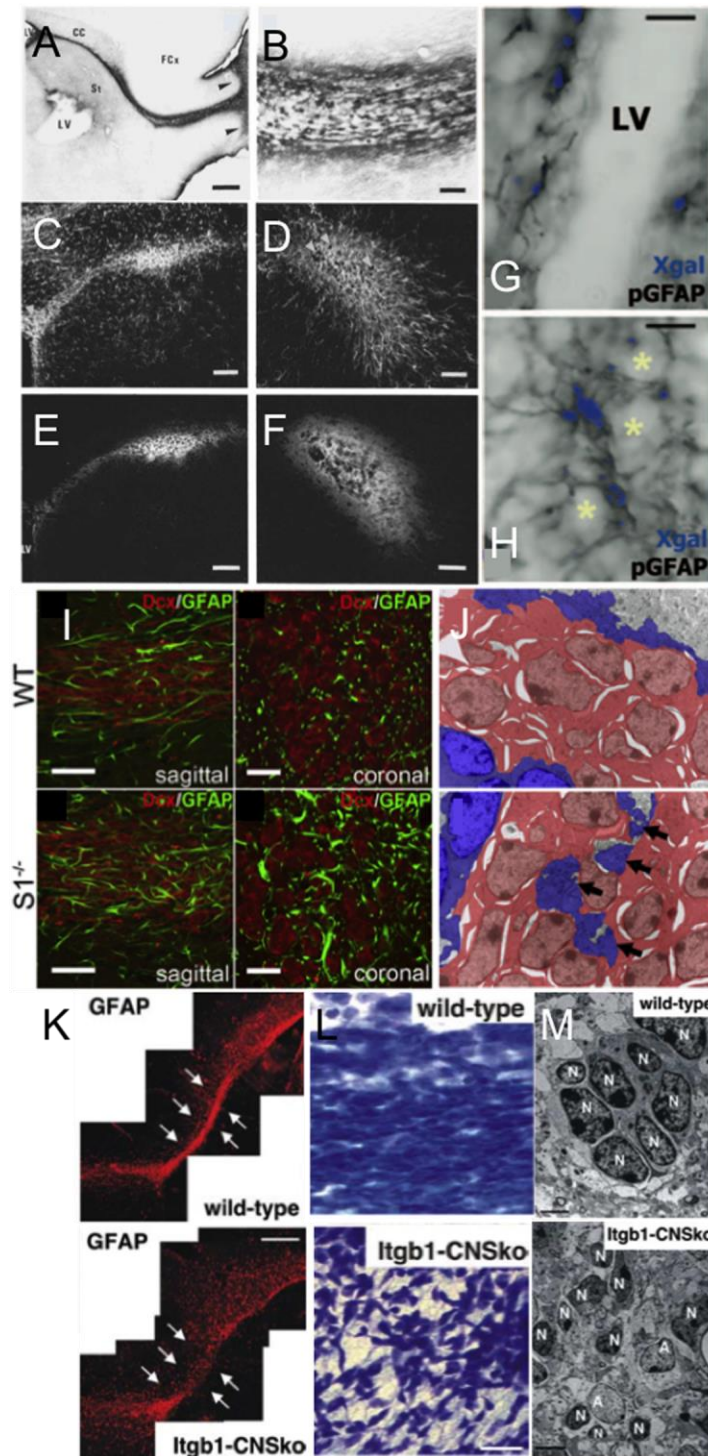
### ***III- 3.c Spécialisation de la matrice extracellulaire du courant de migration rostral et du bulbe olfactif***

Comme mentionné précédemment, il n'existe pas de preuve directe de la régulation de la migration des neuroblastes par les astrocytes. Toutefois, différentes observations montrent une interaction entre ces cellules. Les études de la MEC font partie des travaux suggérant un rôle des astrocytes dans la régulation de la neurogenèse et certaines sont explicitées ci-dessous. Tout d'abord, la Tnc est exprimée dans le CMR et pourrait participer à la formation d'une barrière afin de restreindre la migration des neuroblastes hors du CMR (Jankovski & Sotelo 1996; Peretto *et al.* 2005). En effet, dans la ZSV et le CMR, la Tnc est exprimée par les astrocytes (Figure 28A-H). Une autre étude a montré que l'expression de Slit1 par les neuroblastes permet leur migration dans le CMR en repoussant les astrocytes qui expriment les récepteurs Robo 2 et 3 (Figure 28I, J) (Kaneko *et al.* 2010). Ensuite, l'intégrine  $\beta 1$  est exprimée par les neuroblastes et permet la formation des chaînes. En effet, les souris knockout pour l'intégrine  $\beta 1$  présentent une désorganisation du CMR avec une perturbation de la formation des chaînes de neuroblastes et du tube astroglial. On trouve notamment des astrocytes entre les neuroblastes qui ne sont plus accolés les uns aux autres (Figure 28K-M) (Belvindrah *et al.* 2007). Enfin, l'expression de la métalloprotéase ADAM2 est impliquée dans la migration des neuroblastes du cerveau postnatal. En effet, les neuroblastes des animaux knockout migrent plus lentement et ADAM2 pourrait être un facteur important dans la régulation de l'interaction entre neuroblastes. Le rôle d'ADAM2 durant la

neurogenèse adulte (après P30) reste toutefois à analyser (Murase *et al.* 2008). Ces quatre études convergent donc vers une spécialisation des astrocytes du CMR qui pourraient être des régulateurs de la migration des neuroblastes.

Au niveau du BO, l'expression de la Tenascin-R et de Reelin permet le détachement des neuroblastes du CMR et leur migration dans le BO (Saghatelyan *et al.* 2004; Hack *et al.* 2002).





### Figure 28: Lien entre les astrocytes du CMR et la MEC

(A-B) L'immunomarquage sur coupe sagittale de la Tnc montre l'expression très restreinte de la Tnc au niveau de la ZSV, du CMR et dans le BO (à droite vers les flèches). CC, Corpus callosum ; FCx, Frontal Cortex ; LV, Lateral Ventricle ; St, Striatum. (B) Le marquage dans cette étude est similaire à celui observé en Figure 26, c'est à dire extracellulaire avec des espaces vides (astérisques) qui semblent être des cellules. (C-F) Co-immunomarquage sur coupe coronale de GFAP (C et D) et Tnc (E et F) dans la partie dorsale de la ZSV (C et E) ou dans le CMR (D et F). On observe que la Tnc correspond aux zones enrichies en astrocytes GFAP positifs. De plus, les espaces observés dans le marquage par la Tnc correspondent à des espaces dans le marquage GFAP (pointes de flèche) suggérant la présence d'autres cellules n'exprimant pas la Tnc et qui sont des neuroblastes d'après les travaux présentés précédemment. Barres d'échelle 500  $\mu\text{m}$  (A), 40  $\mu\text{m}$  (B), 100  $\mu\text{m}$  (C et E) et 60  $\mu\text{m}$  (D et F). (G-H) Le marquage Xgal sur des souris transgéniques où une cassette LacZ est insérée dans le gène Tnc (animaux rapporteurs de l'expression de la Tnc) permet de voir que la Tnc est exprimée par les astrocytes marqués par la GFAP dans (G) la ZSV et (H) le CMR. Les astérisques indiquent les neuroblastes. Ces cellules n'expriment pas la Tnc. LV, Lateral ventricle. Barre d'échelle 15  $\mu\text{m}$ . (I-J) Caractérisation du CMR dans les souris knockout pour Slit1 ( $S1^{-/-}$ ). (I) Le co-immunomarquage des neuroblastes (rouge) et des astrocytes (vert) montre l'augmentation du marquage des processus astrocytaires dans le CMR et la diminution de leur organisation en parallèle du CMR (panel de gauche, coupe sagittale). Barres d'échelle : coupes sagittales, 50  $\mu\text{m}$  ; coupes coronales, 20  $\mu\text{m}$ . (J) L'observation de processus astrocytaires (bleu) envahissant les chaînes de neuroblastes (rouge) est confirmée par ces reconstructions d'image de microscopie électronique. Barre d'échelle 5  $\mu\text{m}$ . (K-M) Caractérisation du CMR dans les souris knockout pour l'intégrine  $\beta 1$  ( $Itgb-1\text{CNSko}$ ). (K) L'immunomarquage GFAP montre la désorganisation du réseau astrocytaire associé au CMR avec un marquage plus diffus et une difficulté à identifier le tube astrocytaire. Barre d'échelle 440  $\mu\text{m}$ . (L) Grâce à un marquage Nissl sur coupe sagittale, on observe une désorganisation des cellules dans le CMR. Contrairement à des animaux sauvages qui présentent des cellules organisées longitudinalement, les cellules des animaux knockout ont des processus allant dans toutes les directions. Barre d'échelle 45  $\mu\text{m}$ . (M) En microscopie électronique on observe également une dissociation des chaînes de neuroblastes et des astrocytes sont trouvés entre les neuroblastes. Barres d'échelle 7 et 13  $\mu\text{m}$ . Illustrations de Jankovski & Sotelo (1996) (A-F), Kazanis *et al.* (2007) (G-H), Kaneko *et al.* (2010) (I-J) et Belvindrah *et al.* (2007) (K-M).

### III- 3.d Les Tenascines régulent la migration des neuroblastes

#### Versatilité de structure et de fonction de la Tenascine-C

Les molécules Tenascines sont composées de différents domaines, dont des séquences répétées de domaines de type fibronectin de type III (FNIII) (Faissner & Reinhard 2015). Dans la Tnc, six des séquences FNIII répétées peuvent être alternativement épissées et acquérir ainsi des rôles différents en étant un élément attracteur ou répulsif (Figure 29) (Joester & Faissner 1999; Scholze *et al.* 1996; Giblin & Midwood 2015). En plus de cette variabilité, les cellules répondent également de manière différente à la Tnc (Scholze *et al.* 1996). Comme mentionné précédemment, la MEC participe au recrutement de facteurs de croissance. A l'inverse, l'internalisation de facteurs peut influencer l'expression des différentes isoformes de Tnc et ainsi modifier les propriétés de la MEC (Wiese 2012).

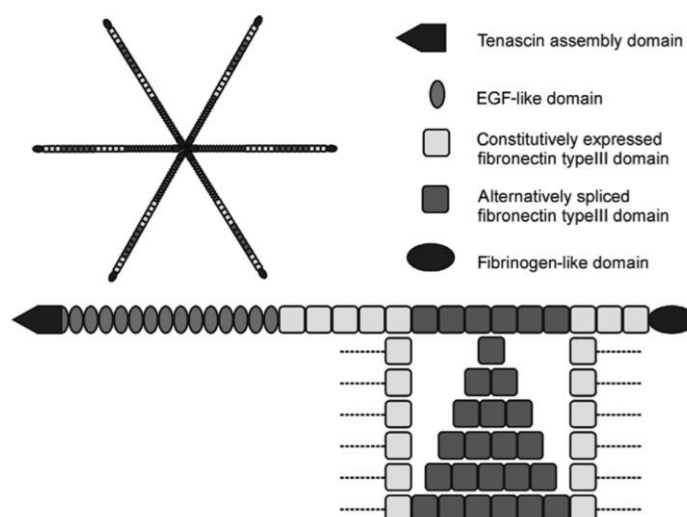


Figure 29 : Structure de la Tnc

Les molécules Tenascines sont composées d'un motif riche en cystéine en partie N-ter, de 14,5 domaines de type EGF, de 8 à 14 domaines de type fibronectin de type III (FNIII) et une partie C ter, homologue à la fibrinogène bêta. 6 molécules de Tnc s'assemblent par leur partie N ter pour former la structure hexamérique identifiée dans la MEC. Illustration de Theocharidis *et al.* (2014).

### **Les Tenascines peuvent réguler la neurogenèse adulte**

La Tnc est exprimée par les astrocytes de la ZSV et du CMR (Figure 28A-H) (Kazanis *et al.* 2007; Jankovski & Sotelo 1996). La Tnc est également observée dans la niche de cellules souches d'autres organes et dans les cellules de glie radiaire durant le développement, suggérant un rôle important de cette molécule dans la constitution de l'environnement des cellules souches. De plus, l'expression de la Tnc est augmentée dans de nombreuses tumeurs (Faissner & Reinhard 2015). Les souris knockout pour la Tnc présentent une augmentation du nombre de clusters de neuroblastes dans la ZSV. Toutefois, on n'observe aucun changement de prolifération, du nombre de neuroblastes ou du nombre d'interneurones dans le BO. Ces animaux ne présentent pas d'altération de la régénération de la neurogenèse adulte après suppression des progéniteurs (Kazanis *et al.* 2007). La question du rôle de la Tnc dans la régulation de la neurogenèse adulte et possiblement de la migration des neuroblastes reste donc à approfondir.

La Tenascin-R est exprimée dans la couche des cellules granulaires du BO et permet aux neuroblastes de se détacher et d'initier une migration individuelle dans le BO (Saghatelian *et al.* 2004). Dans l'hippocampe de souris knockout pour la Tenascin-R on observe une augmentation d'interneurones générés et de l'expression de gènes spécifiant un destin d'interneurone. Ceci suggère un rôle des molécules de la MEC dans le devenir des cellules (Faissner & Reinhard 2015).

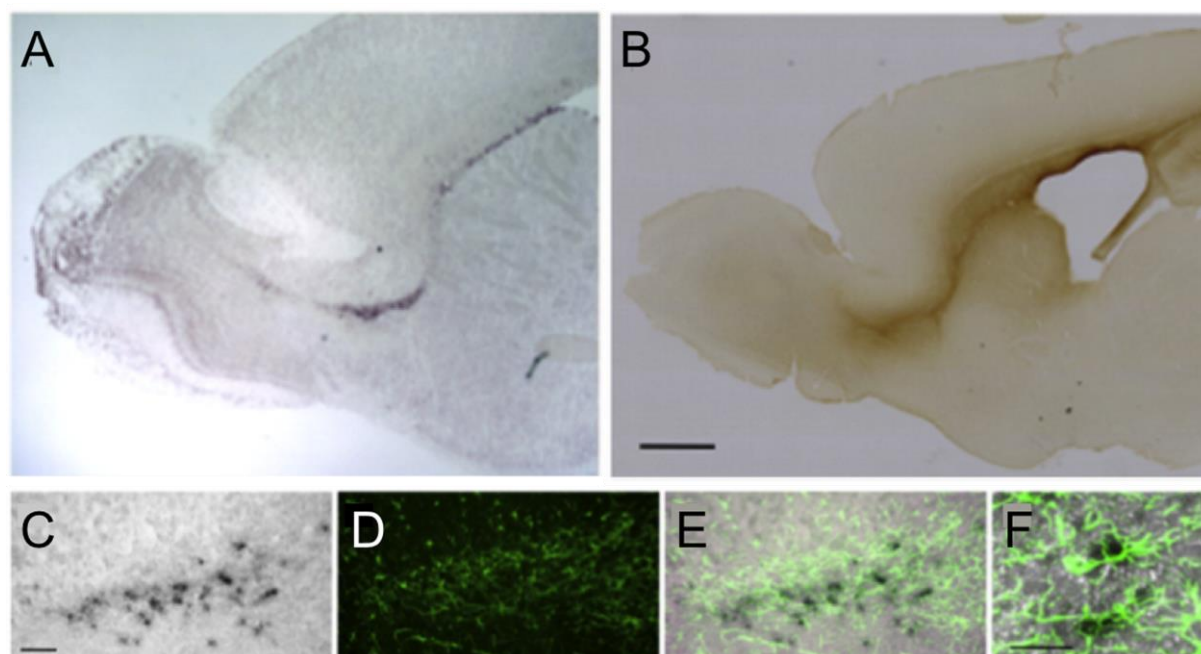
### **Régulation de l'expression de la Tenascin-C**

Otx2 régule l'expression de certaines molécules de la MEC dont la Tnc (Partie II- 2.f, p.55) (Nguyen-Ba-Charvet *et al.* 1998). D'autres molécules de signalisation intercellulaire telles que EGF régulent l'expression de la Tnc par les astrocytes. De plus, l'expression des différents variants peut être régulée par FGF-2 ou TGF- $\beta$ 1 (Faissner & Reinhard 2015). Pax6, une autre homéoprotéine, peut également réguler l'expression des différents variants de la Tnc (Holst *et al.* 2007). Une possible implication d'Otx2 dans la régulation de l'épissage de la Tnc n'est pas connue.

Ainsi, la régulation de cette protéine de la MEC est complexe et les molécules présentes dans la niche de la ZSV pourraient moduler son expression et ses variants.

### III- 3.e La Thrombospondine-4 régule la migration des neuroblastes

La Thrombospondine-4 (Thbs4) est exprimée, chez la souris adulte, dans la ZSV, le CMR, le corps calleux et l'hippocampe. Les astrocytes expriment Thbs4 dans la ZSV et le CMR et l'étude de l'expression de Thbs4 dans le CMR a montré son expression exclusivement par des astrocytes. De plus, tous les astrocytes dans le CMR ne sécrètent pas Thbs4, ce qui suggère une spécialisation de certains astrocytes (Figure 30) (Girard *et al.* 2014; Benner *et al.* 2013).

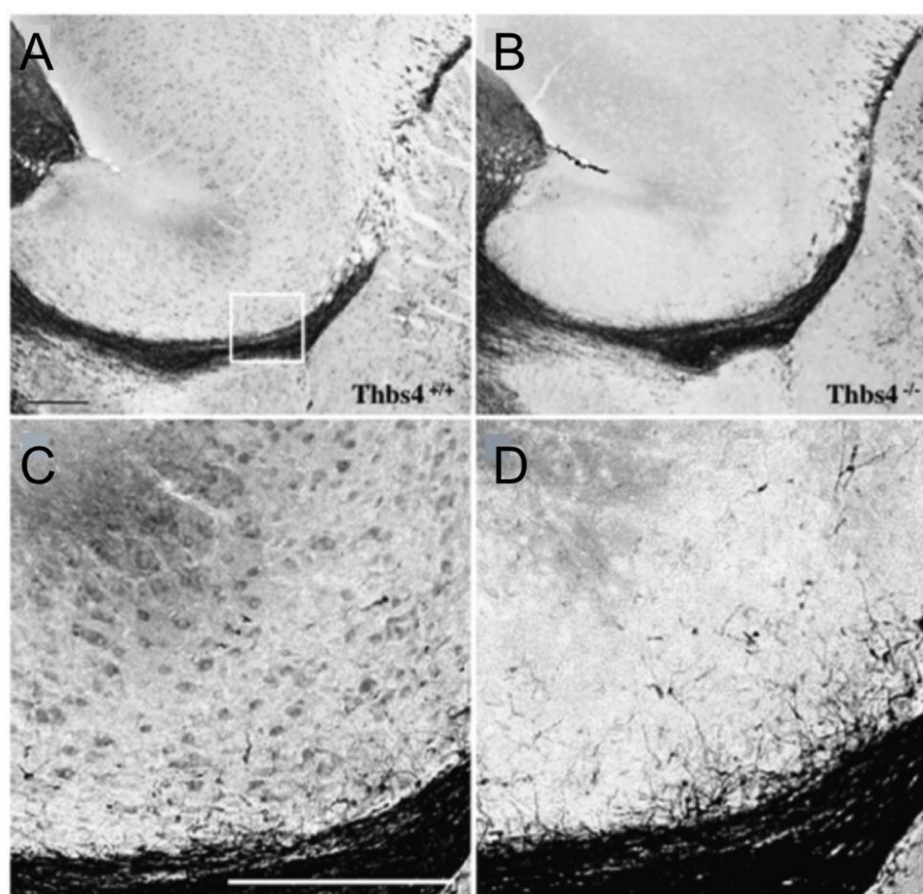


**Figure 30 : Thbs4 est exprimé par les astrocytes du réseau ZSV-CMR**

(A) Dans ces coupes sagittales d'animaux à P60, les ARNm de Thbs4 sont détectés exclusivement dans la ZSV et le CMR et (B) l'immunomarquage atteste de l'expression de la protéine exclusivement dans ces régions. Barre d'échelle 1mm. (C) Les ARNm de Thbs4 sont également observés dans le CMR et (D-E) et colocalisent avec un immunomarquage GFAP. (F) À fort grossissement, on observe que Thbs4 est exprimée par les astrocytes. Illustrations de Girard *et al.* (2014).

Les souris knockout pour Thbs4 ne présentent pas de phénotypes majeurs (Figure 31A, B) ni dans la morphologie du CMR, avec notamment des processus astrocytaires entourant les neuroblastes en migration, ni dans la taille du BO, ni dans la densité cellulaire du CMR. Toutefois, ces souris présentent une diminution de 28% des interneurons produits dans le BO par la ZSV. Cette diminution n'est pas due à un changement de prolifération des précurseurs de la ZSV. Une explication provient de l'observation de nombreux neuroblastes avec des processus orientés en

perpendiculaire du CMR alors que les neuroblastes des animaux sauvages sont bien orientés parallèlement au CMR. De plus, de nombreux neuroblastes se trouvent hors du CMR suggérant une migration anarchique des neuroblastes (Figure 31C, D). Les auteurs proposent que l'absence de *Thbs4* puisse entraîner une diminution de l'adhésion des neuroblastes au CMR qui s'en détacheraient (Girard *et al.* 2014). Toutefois, la diminution de la neurogenèse pourrait aussi être une conséquence d'une migration plus lente des neuroblastes qui entreraient en apoptose avant d'avoir rejoint le BO.



**Figure 31 : Organisation des neuroblastes dans le CMR de souris sauvages et knockout pour *Thbs4***

(A-B) L'immunomarquage des neuroblastes par DCX ne montre pas de défaut dans la formation du CMR des animaux knockout pour *Thbs4* (à droite). Barre d'échelle 250  $\mu$ m. (C-D) Toutefois, à fort grossissement, on observe chez les animaux knockout (à droite) de nombreux processus orientés de manière perpendiculaire au CMR et davantage de cellules migrant hors du CMR. Barre d'échelle 125  $\mu$ m. Illustrations de Girard *et al.* (2014).

### **III- 4. Différents types d'astrocytes sont impliqués dans la neurogenèse adulte**

Les astrocytes sont une population difficile à définir et sont impliqués dans de nombreuses fonctions du système nerveux central (Annexe L). La compréhension de ces cellules est ralentie par le peu de marqueurs, identifiés (Annexe M). Ainsi, le terme astrocytes regroupe des populations hétérogènes qui ont des fonctions spécialisées. Dans la ZSV, différents types d'astrocytes ont été décrits, principalement sur des critères morphologiques (Shen *et al.* 2008; Doetsch *et al.* 1997). Ces astrocytes ont des fonctions différentes, certains constituent le pool de cellules souches, tandis que d'autres semblent impliqués dans la régulation de la neurogenèse.

#### ***III- 4.a Les cellules souches neurales adultes ont un phénotype astrocytaire et illustrent l'hétérogénéité de la population astrocytaire***

Les cellules souches neurales adultes situées dans la ZSV ont été décrites comme appartenant à la lignée astrocytaire (Doetsch *et al.* 1999; Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo 2002). En effet, ces cellules expriment les marqueurs GFAP, Glast et Nestin, typiques de la lignée astrocytaire, et sont capables de produire des neurones chez l'adulte de la même manière que les cellules de glie radiaire durant le développement.

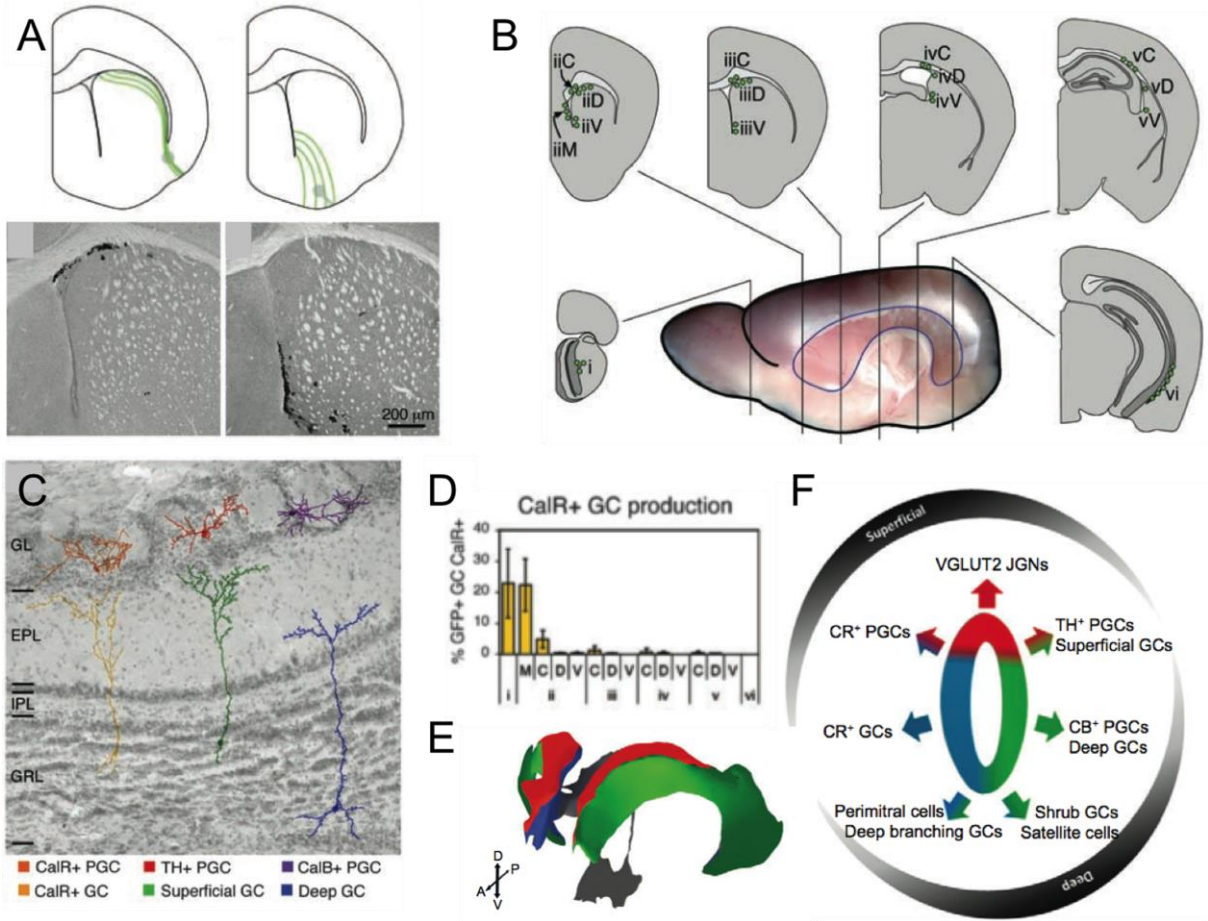
Toutes les cellules souches adultes de la ZSV n'ont pas le même potentiel de production d'interneurones. En effet, différentes cellules souches produisent différents sous-types de neurones de manière spécifique (Merkle *et al.* 2007). Ainsi, une même cellule souche produira un seul sous-type de neurones en fonction de sa localisation spatiale (Figure 32). La formation de ces cellules souches est donc régulée, et illustre l'hétérogénéité de la « super-classe » astrocytaire (Fuatealba *et al.* 2015; Bayraktar *et al.* 2015).

### ***III- 4.b Cellules astrocytaire dans la ZSV***

Si les cellules souches de la ZSV présentent un intérêt particulier dans la compréhension de la neurogenèse adulte, elles ne sont pas les seules cellules à présenter un profil astrocytaire. En effet, dès la description d'astrocytes potentiellement cellules souches par Doetsch *et al.* (1997), les auteurs avaient déjà remarqué la présence de deux types de cellules de type astrocytaires différentes. Les cellules de type B1 qui projettent un cil dans le LCS et contactent les vaisseaux sanguins ont été identifiées plus tard comme étant les cellules souches de la ZSV (Doetsch *et al.* 1999). Le second type d'astrocytes a été nommé cellules de type B2. Ces astrocytes ne possèdent pas de cil, ne génèrent pas de progéniteurs et forment une barrière avec le striatum. Il semble donc que ces astrocytes de type B2 soient des astrocytes plus « classiques » bien que leur rôle ne soit pas connu. Les neuroblastes qui migrent le long du mur ventriculaire sont coincés entre ces deux types d'astrocytes (Doetsch *et al.* 1997).

Une autre étude utilisant des souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur astrocytaire GFAP a montré qu'il existe en réalité trois types de cellules astrocytaires dans la ZSV (Figure 33, p106). Le premier type correspond aux cellules souches qui contactent le ventricule avec leur cil et sont apposées sur la couche de cellules épendymaires. Un second type d'astrocytes est observé plus profondément dans la niche. Ces astrocytes ont été appelés cellules tangentielles de type B et présentent un ou plusieurs processus s'étendant parallèlement à la ZSV. Le soma de cellules se situe près des vaisseaux sanguins et les processus s'étendent entre ou le long des vaisseaux sanguins. De plus, dans la partie dorsale, les processus de ces astrocytes s'étendent de manière antéro-postérieure, dans la direction des neuroblastes en migration. Enfin, le troisième type d'astrocytes est localisé plus profondément dans la ZSV, à la limite avec le striatum. Ceux-ci présentent une morphologie très ramifiée, typique d'astrocytes matures. Leurs ramifications contactent les vaisseaux sanguins et les entourent, suggérant davantage un profil d'astrocyte différencié trouvé dans le parenchyme (Shen *et al.* 2008). Le rôle de ces deux derniers types d'astrocytes sur la neurogenèse n'est pas caractérisé et cette étude est la seule à décrire trois sous-types de cellules astrocytaires dans la ZSV.





### Figure 32 : La production de sous-types de neurones dans le BO provient de différentes cellules souches

(A) L'utilisation d'adénovirus et de leur propriété de transport rétrograde a permis de marquer spécifiquement certaines populations de cellules souches et leurs descendants cellulaires. Deux exemples de sites d'injection de l'adénovirus (panel du haut, point gris) et de domaines marqués de la ZSV (panel du bas). (B) Localisation des différents domaines ciblés contenant les cellules souches dont les descendants cellulaires ont été étudiés. (C) Schéma montrant les différentes populations d'interneurones et leur localisation dans le BO permettant leur classification. GL, Glomerular Layer ; EPL, External Plexiform Layer ; IPL, Internal Plexiform Layer ; GRL, Granule Cell Layer ; CalR, Calretinin ; TH, Thyrosine Hydroxylase ; PGC, PeriGlomerular Cell, GC, Granule Cell. (D) Exemples de quantifications obtenues par suivi des descendants cellulaires. Pour chaque type d'interneurones d'un sous-type, ici les cellules granulaires Calretinin positives, le pourcentage généré par les différents domaines de la ZSV (en B) a été quantifié. Les différents sous-types d'interneurones sont générés préférentiellement par différentes zones de la ZSV. Ainsi, on observe que les interneurones périglomérulaires sont produits préférentiellement par les régions antérieure et dorsale. Les cellules granulaires sont générées par les différentes parties de la ZSV, mais les sous-types générés présentent une spécificité d'origine. Voici un résumé des résultats obtenus :

- Cellules périglomérulaires CalR+ : régions antérieures (i et iiM)
- Cellules périglomérulaires CalB+ : régions ventrales (iiV et iiiV)
- Cellules périglomérulaires TH+ : régions dorsales (iiC à vC)
- Cellules granulaires CalR+ : régions antérieures (i et iiM)
- Cellules granulaires superficielles : régions dorsales (iiC à vC, iiD et iiiD)
- Cellules granulaires profondes : régions ventrales (iiV to vV)

Les régions présentées ici sont issues d'expériences sur des souris juvéniles et les auteurs stipulent qu'ils ont obtenu des données similaires avec des injections à P60. (E) Schéma représentant différents domaines de la ZSV. Le code couleur correspond à celui du schéma (F) représentant les types d'interneurones générés préférentiellement par les différents domaines de la ZSV. La localisation spatiale des cellules souches définit le type d'interneurones générés. Illustrations de Merkle *et al.* (2007) (A-D) et Fiorelli *et al.* (2015) (E-F).

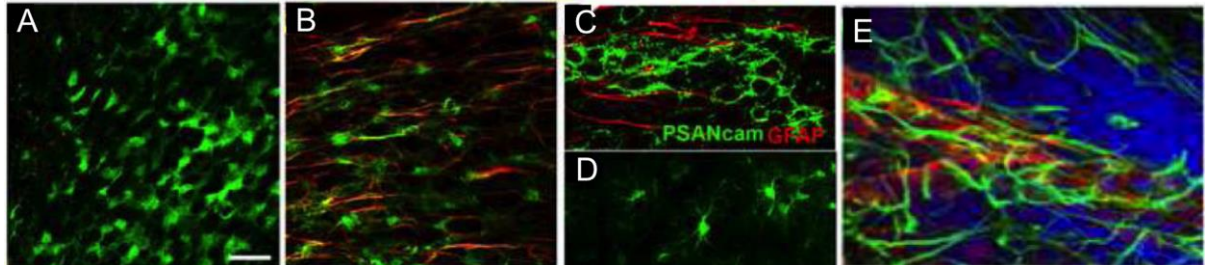


Figure 3.3 : Différents astrocytes dans la ZSV

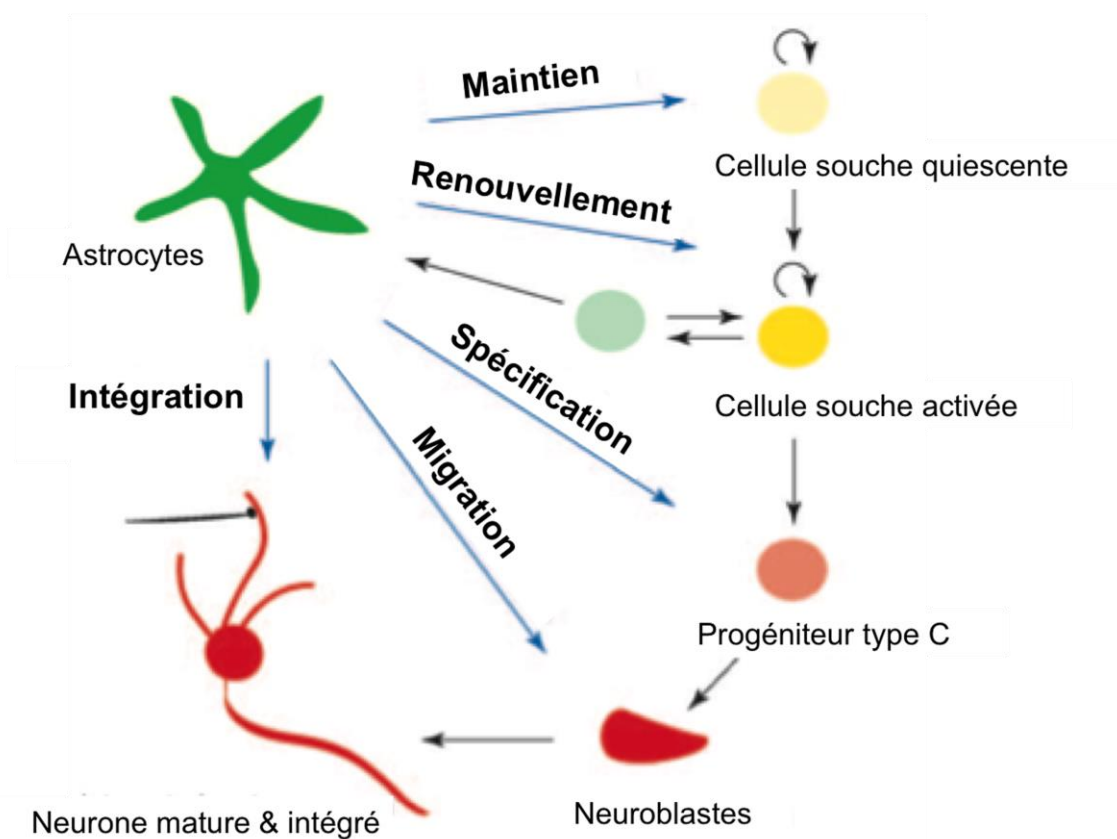
Image en microscopie confocale de la ZSV de souris GFAP-GFP. Les photos A-D ont été prises à différentes profondeurs dans la coupe. (A) A la surface de la ZSV (5  $\mu\text{m}$ ), on trouve les cellules souches situées sous et dans la couche de cellules épendymaires. Barre d'échelle 50  $\mu\text{m}$ . (B) En dessous, à 10  $\mu\text{m}$  de la surface du ventricule, des astrocytes avec une morphologie particulière ont été identifiés. Ils étendent leurs processus (marqués GFAP en rouge) dans une même direction qui correspond (C) à celle des neuroblastes en migration (en vert). Ce sont les cellules tangentielles. (D) Enfin, à 20  $\mu\text{m}$  de la surface de la ZSV, on trouve des astrocytes avec une morphologie typique de ce type cellulaire, avec des processus dans toutes les directions. (E) Les cellules astrocytaires tangentielles possèdent de longs processus (vert) le long des vaisseaux sanguins (rouge). Illustrations de Shen *et al.* (2008).

### ***III- 4.c Les astrocytes associés au courant de migration rostral pourraient constituer un sous-type astrocytaire***

Comme décrit précédemment, il a été montré que les neuroblastes migrent entourés de processus astrocytaires. Aucun marqueur de ces astrocytes n'a été décrit à ce jour et seules les approches par microscopie électronique permettent leur étude. L'identification d'un marqueur pourrait permettre de mieux comprendre la structure et le rôle de ces astrocytes.

### ***III- 4.d Rôle des astrocytes dans la neurogenèse adulte***

Les astrocytes sont donc une classe très hétérogène et il est difficile de déterminer le rôle de chaque sous-type. Toutefois, il est connu que les astrocytes sont des supports de la neurogenèse durant le développement embryonnaire en régulant le guidage axonal et la formation des synapses (Ma *et al.* 2005). Des expériences de culture cellulaire ont mis en évidence que les astrocytes issus de cerveaux de souris nouveau-nés augmentent la neurogenèse de cellules souches issues de la ZSV adulte (Lim & Alvarez-Buylla 1999). D'autre part, des cocultures de cellules souches du gyrus dentelé et d'astrocytes ont montré que les astrocytes issus de l'hippocampe, à l'inverse d'astrocytes issus de la moelle épinière, augmentent la prolifération et le devenir neuronal des cellules. Cet effet est accentué par la co-culture avec des astrocytes issus de l'hippocampe de nouveau-nés (H. Song *et al.* 2002; H.-J. Song *et al.* 2002). Ces différents résultats montrent que les astrocytes présentent des propriétés différentes selon leur stade de développement et leur localisation spatiale. De plus, cela suggère que la régulation de la neurogenèse adulte dépend en partie de ces capacités des astrocytes spécifiquement présents dans les niches (Figure 34) (Ma *et al.* 2005).



**Figure 34 : Illustration des rôles potentiels des astrocytes dans la régulation de la neurogenèse adulte**

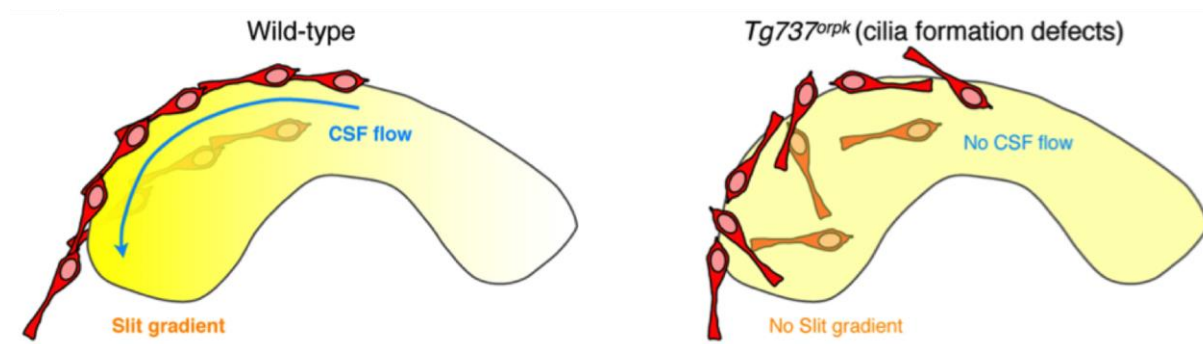
Les astrocytes sécrètent de nombreux facteurs et pourraient ainsi réguler les différents aspects de la neurogenèse adulte dans la ZSV, comme le maintien de la population de cellules souches ou la régulation de leur renouvellement. Ils pourraient également réguler la spécification des progéniteurs et les diriger vers un devenir neuronal. On notera que les cellules souches, étant multipotentes, peuvent produire des astrocytes. Au niveau de la ZSV, mais surtout du CMR, les astrocytes permettraient de réguler la migration des neuroblastes. Enfin, dans le BO, les astrocytes seraient importants pour l'intégration des interneurons dans le réseau préexistant. La localisation des astrocytes et l'étendue de leurs capacités en font des candidats de la régulation de la neurogenèse adulte, mais les études tardent à prouver leur implication directe à ces différentes étapes. Illustration de Ma *et al.* (2005).

### **III- 5. Les plexus choroïdes sont des acteurs de la niche neurogénique adulte**

Les PC sont d'importants régulateurs de l'homéostasie cérébrale et ils sont des acteurs de la niche de la ZSV (Silva-Vargas *et al.* 2016). L'importance de ces organes a été décrite durant la neurogenèse embryonnaire. Dans cette partie seront détaillés les rôles potentiels des PC et du LCS dans la régulation de la neurogenèse adulte.

#### ***III- 5.a Les plexus choroïdes expriment des molécules de répulsion pouvant guider les neuroblastes***

Une première étude montrant un rôle des PC sur la neurogenèse adulte provient du travail de Sawamoto *et al.* (2006) utilisant des souris transgéniques (Tg737<sup>orp<sup>k</sup></sup>) présentant un défaut de formation des cils. Les cellules épendymaires de ces animaux présentent moins de cils, qui sont plus courts et disposés de manière irrégulière. Ceci entraîne une perturbation du flux du LCS. L'infusion dans la partie postérieure du ventricule de la protéine Slit2 couplée à l'alkaline phosphatase permet de visualiser la formation d'un gradient chez les animaux sauvages. Chez les souris Tg737<sup>orp<sup>k</sup></sup>, on observe une perturbation de la répartition de Slit2 d'une part, soulignant la perturbation du flux de LCS, et une migration désordonnée des neuroblastes dans la ZSV d'autre part (Figure 35) (Sawamoto *et al.* 2006). Nguyen-Ba-Charvet *et al.* (2004) avaient déjà montré que les PC sécrètent Slit2 et que cela permettait de repousser les neuroblastes *in vitro*. De plus, la greffe de PC de souris sauvages près du CMR entraîne une perturbation de la migration des neuroblastes qui ne rejoignent plus les BO. Lorsque des PC de souris knockout pour Slit1/2 sont greffés, on observe toujours un défaut de migration, mais moins important qu'avec le PC de souris sauvages, démontrant la capacité des protéines Slit à instruire la migration des neuroblastes (Sawamoto *et al.* 2006). Ces travaux soulignent le fait que le LCS permettrait de réguler la neurogenèse adulte en agissant sur les progéniteurs et non pas sur les cellules souches qui, elles, contactent le LCS.



**Figure 35 : Hypothèse à partir des observations de Sawamoto *et al.***

Le défaut de formation d'un gradient de Slit2 dans le LCS des souris  $Tg737^{orp^k}$  et la perturbation de la migration des neuroblastes suggèrent que le LCS contient des molécules qui vont permettre de guider les neuroblastes vers le BO. Il reste toutefois à prouver qu'il existe des gradients endogènes dans le LCS. Ceci pourrait permettre de réguler la neurogenèse dans les différents domaines de la ZSV de manière distincte. Un lien direct entre l'expression de Slit2 dans les PC et la migration des neuroblastes reste à prouver. En effet, le défaut de formation des cils pourrait entraîner une signalisation différente par les cellules épendymaires pour les neuroblastes. Illustration de Sawada & Sawamoto (2013).

### ***III- 5.b Les plexus choroïdes régulent également la structure et la prolifération dans la zone sous-ventriculaire***

La signalisation au niveau des cellules souches par le LCS pourrait toutefois être un acteur de régulation de la neurogenèse. Les cellules souches expriment à la surface de leur cil l'intégrine VCAM-1 qui se révèle être une protéine importante dans la régulation de la neurogenèse adulte. En effet, bloquer VCAM-1 en utilisant un anticorps entraîne une perte de la structure en pinwheel et une activation des cellules souches quiescentes, qui prolifèrent et se séparent du mur ventriculaire. La présence d'Il1-b dans le LCS permettrait de réguler l'expression de VCAM1 présent au niveau des cils des cellules souches et nécessaire à leur maintien dans la niche (Kokovay *et al.* 2012). Les PC adultes sécrètent également des facteurs mitotiques comme FGF2 soutenant la prolifération (Hayamizu *et al.* 2001; Douet *et al.* 2013), IGF2, important pour le maintien et le renouvellement des cellules souches (Ziegler *et al.* 2012) ou encore des TGF ( $\alpha$  et  $\beta$ ) qui régulent la prolifération cellulaire (Tropepe *et al.* 1997; Wachs *et al.* 2006).

Dans une étude récente, l'importance des PC des ventricules latéraux dans la régulation des propriétés des cellules souches et des progéniteurs a été soulignée. Les auteurs ont utilisés des techniques *in vitro* et *in vivo* pour montrer le rôle régulateur des molécules sécrétées par les PC. Du milieu conditionné avec des PC est appliqué sur des cultures des différents types de cellules souches (activées ou non) ou de progéniteurs purifiés. Des paramètres, tel que le nombre de clone obtenu, sont comparé à des cultures dans des milieux classiques (supplémenté en EGF). Les auteurs ont ainsi observé que le sécrétome des PC contient un large pannel de molécules pouvant réguler les différents aspects de la neurogenèse, depuis la prolifération jusqu'à la différenciation (Silva-Vargas *et al.* 2016).

L'influence du LCS sur les cellules souches neurales adultes et leur spécialisation (une cellule de type B donnera un certain type d'interneurone dans le BO) n'a pas été investiguée à ce jour. Toutefois, des expériences de transplantation de cellules souches dans une autre localisation de la ZSV ont montré qu'elles gardent leur spécificité de production d'interneurones originale. Ceci suggère que la spécialisation des cellules souches provient d'un programme autonome (Merkle *et al.* 2007).



### ***III- 5.c Hypothèse d'une boucle de régulation entre le liquide cébrospinal et la niche neurogénique de la zone sous-ventriculaire***

Le lien direct entre expression et sécrétion de facteurs en provenance des PC et régulation des cellules souches reste toujours à prouver. Si les PC sont capables de réguler la neurogenèse adulte en sécrétant des facteurs de signalisation dans le LCS, il est également possible que ceux-ci modulent l'expression et la sécrétion de ces facteurs en fonction des besoins de la niche. En effet, les PC expriment des récepteurs qui peuvent permettre de recevoir des signaux du LCS. Ainsi, les cellules de la niche, qui peuvent aussi émettre des molécules dans le LCS, vont envoyer des signaux au PC afin de réguler l'expression et la sécrétion des facteurs supportant la neurogenèse (Silva-Vargas *et al.* 2013; Emerich *et al.* 2005).

### **III- 6. Intérêt thérapeutique des recherches sur la neurogenèse adulte**

La découverte de cellules souches dans le cerveau adulte a entraîné de nombreuses recherches sur la possibilité de leur utilisation pour régénérer des parties lésées par un infarctus ou par une maladie neurodégénérative. Cette régénération s'effectuerait soit en stimulant la neurogenèse endogène, soit en greffant des cellules. Cependant, aucune thérapie efficace n'a été découverte à ce jour et le cerveau des mammifères n'offre pas un environnement permissif pour la régénération. La recherche fondamentale est donc nécessaire afin de découvrir les mécanismes permettant la prolifération et la différenciation des cellules souches dans le cerveau adulte. Une combinaison d'approches pourrait permettre un jour la mise au point de thérapie cellulaire en modulant de manière intrinsèque les propriétés des cellules générées, mais également en créant un environnement favorable pour l'intégration de ces nouvelles cellules. C'est ainsi que la recherche sur la MEC et ses récepteurs dans la ZSV, le CMR, le BO, mais aussi d'autres régions du cerveau pourraient permettre de mettre en lumière des molécules clés du processus de neurogenèse afin d'améliorer les greffes ou le détournement de la neurogenèse endogène (Wojcik-Stanaszek *et al.* 2011). L'étude de Silva-Vargas *et al.* (2016) a également permis de montrer l'évolution du secrétome des PC durant le vieillissement. Or la neurogenèse

Les plexus choroïdes sont des régulateurs de la neurogenèse adulte

décline avec l'âge (Partie III- 1.e, p.77). Ainsi, la niche, et notamment les PC, sont des acteurs de la neurogenèse adulte qui pourront permettre d'élaborer des stratégies de maintien de ce processus.

La possibilité d'utiliser les PC comme voie d'entrée de molécules clés régulant la neurogenèse par modification de la MEC, par exemple, serait idéale et limiterait l'utilisation de techniques invasives.

### III- 7. Conclusion Partie 3

La neurogenèse adulte est un processus ancien qui a évolué et qui permet de remplir des fonctions différentes (Paredes, Sorrells *et al.* 2016). Chez la souris, la formation de nouveaux neurones dans le BO permet d'améliorer l'olfaction, un sens particulièrement important chez les rongeurs (Sakamoto *et al.* 2014). Les nouveaux neurones sont produits à partir de cellules souches localisées derrière les cellules épendymaires constituant le mur ventriculaire (Doetsch *et al.* 1999). La niche de la ZSV et le CMR contiennent de nombreuses cellules interagissant afin de réguler la neurogenèse adulte (Bjornsson *et al.* 2015). Les astrocytes dans la ZSV ne sont pas nécessairement des cellules souches et la morphologie des cellules tangentielle suggère qu'elles pourraient participer à la migration des neuroblastes (Shen *et al.* 2008). De la même manière, dans le CMR, les astrocytes présentent une morphologie unique avec des processus dans le sens de migration des neuroblastes (Whitman *et al.* 2009). En plus de ces éléments morphologiques, les astrocytes de la ZSV et du CMR expriment la *Tnc* et la *Thbs4*, qui ne sont pas observées dans d'autres régions du cerveau (Jankovski & Sotelo 1996; Girard *et al.* 2014). La *Thbs4* est exprimée exclusivement par les astrocytes et les animaux knockout pour cette molécule présentent des défauts de neurogenèse adulte (Girard *et al.* 2014). Ces éléments suggèrent que les astrocytes et la MEC permettent de contrôler la migration des neuroblastes. Un autre composant de la niche pouvant réguler la migration des neuroblastes sont les PC qui sécrètent des molécules de répulsion dans le LCS (Bjornsson *et al.* 2015). Ainsi, la neurogenèse adulte est un processus impliquant des régulations complexes.

## Problématique

Les PC sécrètent le LCS qui baigne le système nerveux central et permet de distribuer des facteurs dans le parenchyme afin de contrôler l'homéostasie cérébrale (Lun, Monuki, *et al.* 2015; Zappaterra & lehtinen 2012). Les PC des différents ventricules forment une population hétérogène, suggérant une spécialisation pour la signalisation dans le système nerveux central (Lun, Johnson, *et al.* 2015). Tous les PC expriment l'homéoprotéine Otx2. Ce facteur de transcription est impliqué notamment dans la formation du système nerveux central, la neurogenèse embryonnaire et le développement des PC, bien que son rôle diffère selon le PC étudié (Acampora *et al.* 2001; Fossat *et al.* 2006; Hoch *et al.* 2015; Johansson *et al.* 2013). Les homéoprotéines peuvent réguler la transcription et la traduction, et grâce à leur transfert entre cellules, elles peuvent avoir des rôles non-cellulaire-autonomes (Dubnau & Struhl 1996). En effet, Otx2 est aussi sécrétée dans le LCS et transfère alors dans certaines cellules du cerveau (Spatazza, Lee, *et al.* 2013), et potentiellement dans les niches neurogéniques. La formation des nouveaux neurones est régulée en partie par des facteurs du LCS et par les composantes de la niche de la ZSV (Bjornsson *et al.* 2015).

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'Otx2 régule l'homéostasie des PC et la neurogenèse chez la souris adulte. Cette régulation peut être cellulaire autonome dans les PC, en modifiant la sécrétion de facteurs contrôlant la neurogenèse, ou non-cellulaire autonome après transfert de la protéine dans la ZSV.

Dans une première étude, nous nous sommes intéressés aux fonctions d'Otx2 dans les PC adultes. Des approches génomiques, sur des animaux knockdown pour *Otx2*, et biochimiques, sur des animaux sauvages, ont permis de déterminer des fonctions régulées par Otx2 dans deux types de PC et d'identifier des partenaires protéiques d'Otx2. Nous avons montré que (i) les PC des ventricules latéraux et du 4<sup>e</sup> ventricule sont différents chez l'adulte (ii) Otx2 régule l'expression de gènes impliqués dans la signalisation extracellulaire et dans le maintien des PC (iii) la dérégulation de certains gènes après knockdown est spécifique d'un type de PC et suggère des fonctions différentes d'Otx2 dans les deux types de PC étudiés (iv) Otx2 pourrait être impliquée à d'autres niveaux que la régulation transcriptionnelle.

Dans une seconde étude, nous nous sommes intéressés au rôle d'Otx2 dans la régulation de la neurogenèse adulte. L'étude *in vivo* de la neurogenèse par des approches de biochimie et de biologie moléculaire sur deux modèles transgéniques murins a permis de déterminer le rôle de l'expression d'Otx2 dans les PC et de son transfert dans la régulation de la neurogenèse adulte. Nous avons montré que (i) l'expression d'Otx2 dans les PC régule la formation de nouveaux neurones dans le BO (ii) Otx2 transfère dans les astrocytes de la ZSV (iii) le transfert d'Otx2 est suffisant pour réguler la formation de nouveaux neurones dans le BO (iv) le knockdown d'Otx2 dans les PC modifie l'expression de protéines de la MEC sécrétées par les astrocytes.

## **IV- Résultats Partie 1.**

### **Fonctions d'Otx2 dans les plexus choroïdes adultes et partenaires protéiques**



## IV- 1. Introduction

Les PC contribuent à de nombreuses fonctions permettant de former et maintenir le système nerveux central. Une analyse transcriptomique des PC durant le développement embryonnaire par séquençage des ARN a pu montrer l'hétérogénéité des PC des ventricules latéraux et du 4<sup>e</sup> ventricule (Lun, Johnson, *et al.* 2015). Une étude de délétion d'*Otx2* durant le développement des PC souligne également cette différence entre les PC. En effet, si l'expression d'*Otx2* est nécessaire au développement de tous les PC, elle n'est requise que dans le PC du 4<sup>e</sup> ventricule pour maintenir cette structure (Johansson *et al.* 2013). Les homéoprotéines peuvent réguler, en plus de la transcription des gènes, la traduction des ARNm (Dubnau & Struhl 1996). Cette diversité de fonctions et de partenaires des homéoprotéines suggère une régulation de l'homéostasie cellulaire à plusieurs niveaux. En plus de ces rôles variés dans un type cellulaire, les fonctions et les interactions d'une protéine changent selon le type cellulaire étudié.

Dans cette première étude, nous nous sommes intéressés au rôle d'*Otx2* dans les PC adultes. Pour cela, nous avons utilisé principalement un modèle murin transgénique permettant de supprimer l'expression d'*Otx2* dans les PC adultes (décrit dans Spatazza, Lee, *et al.* 2013), puis réalisé et analysé des séquençages des ARN sur ces PC. Une analyse transcriptomique d'un modèle constitutif de knockdown d'*Otx2* a également été réalisée, uniquement sur le PC du 4<sup>e</sup> ventricule. La seconde approche de cette étude est une recherche de partenaires protéiques d'*Otx2* afin de mieux comprendre les niveaux de régulation d'*Otx2* dans cette structure. Pour cela, nous avons réalisé des co-immunoprécipitations avec un anticorps anti-*Otx2* puis identifié les protéines liées à *Otx2* par spectrométrie de masse. Les questions développées dans cette étude sont :

- Les PC des ventricules latéraux et du 4<sup>e</sup> ventricule sont-ils similaires chez l'adulte ?
- Quelle est l'importance d'*Otx2* dans l'homéostasie et l'hétérogénéité des PC adultes ?
- A quel niveau de régulation est associé *Otx2* ?



## **IV- 2. Publication à soumettre**

### **Adult choroid plexus transcriptome heterogeneity and homeostatic role of Otx2 homeoprotein**

Anabelle Planques, Clémence Bernard, Alain Prochiantz, Ariel A Di Nardo\*

Centre for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS UMR 7241/INSERM U1050, PSL Research University, Paris, France

\*corresponding author: ariel.dinardo@college-de-france.fr

#### **Abstract**

Choroid plexus secrete cerebrospinal fluid important for brain development and homeostasis. Spatial and temporal heterogeneity of mouse choroid plexus functions have been shown in the late embryo, however to what extent such heterogeneity is retained in the adult is unknown. The Otx2 homeoprotein is critical for choroid plexus development and remains highly expressed in adult choroid plexus. Through RNA sequencing and mass spectrometry analyses, we confirm choroid plexus heterogeneity in the adult and reveal putative roles for Otx2 in choroid plexus function. Identified targets implicate Otx2 in chromatin structure, DNA repair, RNA processing, cell signaling, cell adhesion and endosomes, suggesting Otx2 retains important roles in choroid plexus function and brain homeostasis throughout life.

## Introduction

Choroid plexus (CP) are located in the four ventricles of the brain and secrete the cerebrospinal fluid (CSF) containing molecules that regulate brain development and homeostasis (lehtinen *et al.* 2013). Different signaling properties might exist between CP from different ventricles as embryonic CP present specific gene expression (Lun *et al.* 2015). Although, adult CP heterogeneity has been described for some genes, complete characterization of lateral ventricle CP (Lat V CP) and 4<sup>th</sup> ventricle CP (4<sup>th</sup> V CP) is still lacking.

Homeoproteins are transcription factors important for embryonic development and adult brain maintenance. Several homeoproteins have been shown have functions beyond transcription including translation regulation, DNA repair and signal transduction (Rezsohazy 2014; Prochiantz & Di Nardo 2015). Otx2 homeoprotein is important for CP embryonic development and functions (Johansson *et al.* 2013). However, temporal and spatial heterogeneity is evident, as its role evolves during development and differs between CP (Lun *et al.* 2015). For example, in late embryonic development Otx2 is required for the maintenance of the 4<sup>th</sup> V CP but not Lat V CP (Johansson *et al.* 2013). In adult, Otx2 is still strongly expressed by CP but its role has not been investigated (Spatazza *et al.* 2013).

While several studies have explored the molecular partners of Otx2, they were typically restricted to embryonic contexts (Fossat *et al.* 2006; Beby & Lamonerie 2013; Hoch *et al.* 2015). In the adult mouse, recent analyses of Otx2 protein partners and transcription regulation have been performed on retina (Samuel *et al.* 2014; Fant *et al.* 2015). These studies revealed targets implicated in tissue development and homeostasis, and confirmed that Otx2 not only binds multiple sites across DNA, but also discovered interactions with RNA machinery for processing, export, and translation.

We now address spatial heterogeneity of adult CP by providing complete transcriptomes of adult CP from Lat V CP and 4<sup>th</sup> V CP. To examine the role of Otx2 in adult CP, we use mouse models for either constitutive *Otx2* knockdown or specific conditional knockdown of *Otx2* in CP. different origin with RNA sequencing approach. Furthermore, we also provide list of potential Otx2 proteins partners in adult CP through proteomics analysis.

## Results

### *Similarity between adult choroid plexus of different ventricles*

To gain insight into the role of *Otx2* in adult CP function, we performed RNA sequencing analysis with two mouse models. The first used 3 month-old *Otx2<sup>lox/lox</sup>* mice (*Otx2-lox* mice hereafter) for conditional knockdown of *Otx2* specifically in the CP through intracerebroventricular (icv) injections of Cre-Tat recombinant protein (Spatazza *et al.* 2013). In these experiments, the Lat and 4<sup>th</sup> V CP were dissected and pooled separately from Cre-Tat injected mice and from control vehicle-injected mice. While Cre-Tat is injected in both lateral ventricles only, we have previously shown that the level of *Otx2* knockdown in the 4<sup>th</sup> V CP is proportional to that in the lateral ventricles (Planques *et al.*, in preparation). The second model used *Otx2<sup>+ /GFP</sup>* mice (*Otx2-GFP* mice hereafter) as a constitutive heterozygous knockout mutant with ~50% *Otx2* protein levels compared to wild type (Bernard *et al.* 2014). For this model, the 4<sup>th</sup> V CP were dissected and pooled from 3 month-old mice for wild type versus mutant comparison.

While previous studies have analyzed the transcriptome of adult CP, they did not take into account potential heterogeneity between ventricles (Marques *et al.* 2011; Kratzer *et al.* 2013; Saunders *et al.* 2015). Indeed, differences in RNA expression between Lat and 4<sup>th</sup> V CP has been shown for embryonic CP (Lun *et al.* 2015), suggesting heterogeneity may be prevalent in the adult. To address this question, we compared RNA expression from Lat and 4<sup>th</sup> V CP of vehicle-injected mice. However, to ensure the icv injection of vehicle solution did not result in significant changes in gene expression, we first compared 4<sup>th</sup> V CP of vehicle-injected *Otx2-lox* mice with that of wild type *Otx2-GFP* mice (data not shown). Among the top 10% expressed genes, only *AY036118* and *Zbtb20* were found to be significantly different (higher) in the *Otx2-lox* mice. We thus concluded that vehicle-injected mice were equivalent to wild type mice.

The normalized and filtered dataset of Lat versus 4<sup>th</sup> V CP of vehicle-injected *Otx2-lox* mice provided a list of 14 576 genes. Of the 50 most-expressed genes, 5 genes (*Ctsd*, *Clu*, *Cntn1*, *Igf2* and *Gpm6a*) were significantly different ( $p\text{-adj} < 0.05$ ) between the two CP (Table 1). Ontology analysis showed enrichment in genes for signaling, transport, glycoproteins and stress response within this restrained list (Figure 1A). Expanding ontology analysis to global gene expression separately for Lat

and 4<sup>th</sup> V CP showed notable enrichment in phosphoprotein, acetylation, alternative splicing, nucleotide binding, and transport (Figure 1B). The ontological profiles are very similar for both CP, suggesting they both have important functions in energy metabolism, protein signaling and RNA processing.

#### *Heterogeneity between lateral and 4<sup>th</sup> ventricle choroid plexus*

Comparison of gene expression between Lat and 4<sup>th</sup> V CP of vehicle-injected Otx2-lox mice revealed 586 differentially expressed genes ( $p\text{-adj} < 0.05$ , Figure 1C). The 25 most enriched genes in either CP showed a bias for transcription factors (Table 2). This finding is similar to what was reported for embryonic CP (Lun *et al.* 2015). In comparison to embryonic enrichment, 7 of 25 enriched genes in lateral ventricle matched, while 8 of 25 enriched genes in 4<sup>th</sup> V CP matched, suggesting spatial heterogeneity is somewhat maintained in the adult. However, the range in fold-changes observed in adult CP enriched genes is ~2 to ~90, while the range is ~8 to ~215 in the embryo, suggesting spatial heterogeneity is less pronounced in the adult compared to the embryo. Analysis by qRT-PCR of 4 genes (*Penk*, *Shh*, *Sod3*, and *Ttr*) in adult CP was previously reported (Lun *et al.* 2015); with the exception of *Ttr*, we find similar results (Table S1, *Shh* is not expressed in adult CP and is not included in Table).

Ontology analysis of the differentially expressed genes showed a strong enrichment in Lat V CP for glycoproteins, signal and secreted proteins (Figure 1D). These groups were also slightly enriched in 4<sup>th</sup> V CP. However, Lat V CP showed uniquely strong enrichment of membrane-related terms and cell adhesion, while 4<sup>th</sup> V CP showed unique enrichment for alternative splicing and transcription factors.

#### *Conditional knockdown of Otx2 in adult CP*

The conditional knockdown of Otx2 led to significant changes of 375 genes in Lat V CP and 808 genes in 4<sup>th</sup> V CP ( $p\text{-adj} < 0.05$ ). The top ten upregulated and downregulated genes show a range of functions, including secreted proteins, enzymes, trafficking, etc (Table 3). While there is significant overlap in the genes with altered CP expressed (Figure 2A), the 4<sup>th</sup> V CP seems more susceptible to loss of Otx2 activity. The response to Otx2 knockdown results in a rather even distribution of upregulation (522 genes) and downregulation (392 genes) among the CP. However, ontological analysis reveals that the downregulated genes in both CP show higher

levels of enrichment in significantly altered classes, suggesting that upregulated genes have more broadly distributed functions (Figure 2C-D). Interestingly, both CP have similar ontology enrichment in downregulated genes, indicated that *Otx2* is generally important for the expression of membrane proteins, glycoproteins, signaling proteins and cell adhesion proteins. While some of these functions are recapitulated in the upregulated genes, there is much more heterogeneity between the Lat and 4<sup>th</sup> V CP. The Lat V CP show more immune response ontology while the 4<sup>th</sup> V CP show more signaling related ontology.

#### *Constitutive knockdown of Otx2 in adult CP*

The constitutively heterozygote *Otx2*-GFP adult mice showed significant expression changes in 527 genes of the 4<sup>th</sup> V CP ( $p < 0.05$ ), which is comparatively less than for conditional *Otx2* knockdown in 4<sup>th</sup> V CP (Figure 3A). These changes were relatively balanced between upregulation (272 genes) and downregulation (255 genes), and ontology analysis showed shared terms that include glycoprotein, signal, membrane-related, and secreted classes (Figure 3B). The upregulated genes also showed enrichment of cell adhesion and alternative splicing, while downregulated genes showed enrichment of trafficking and transport.

Comparison of gene expression changes in 4<sup>th</sup> V CP of constitutive and conditional models revealed an overlap of more than 80 genes in either upregulated or downregulated genes. This represented about half the identified expression changes in *Otx2*-GFP mice, but less than a third of changes in the conditional model. When genes from Lat V CP conditional *Otx2* knockdown are included in the analysis, we identified 43 genes globally upregulated and 33 genes globally downregulated (Table S2). These genes could be direct targets of *Otx2* transcription regulation or share common pathways.

#### *Altered expression of CP secreted factors*

Given that our various ontology analyses often evoked secreted factors, we opted to focus on CP factors secreted in CSF and implicated in embryonic and/or adult neurogenesis (Table 4). Factors implicated in embryonic neurogenesis include *Shh*, BMPs and Wnts (Reviewed in Bjornsson *et al.* 2015). While *Shh* expression was not observed in either CP of the conditional model, *Otx2*-GFP mice showed significant *Shh* expression. Between the various *BMP* and *Wnt* family genes, only

*BMP7* and *Wnt2b* were differentially expressed in *Otx2-lox* mice. Wnt signaling is perturbed in embryos with conditional *Otx2* CP knockdown, and it has been proposed that *Wnt4* and *Tgm2*, enriched in the CSF of mutant mice, are the effectors (Johansson *et al.* 2013). While *Wnt4* was poorly expressed (~20 mean reads) and unchanged in *Otx2-lox* mice, *Tgm2* was significantly upregulated in 4<sup>th</sup> V CP, suggesting *Otx2* retains some embryonic functions.

*Igf2* and *Slit1/2* have been found to regulate both embryonic and adult neurogenesis (Hu 1999; Nguyen-Ba-Charvet *et al.* 2004; Sawamoto *et al.* 2006; lehtinen *et al.* 2011; Ziegler *et al.* 2012). While *Slit1* is not expressed and *Slit3* is only weakly expressed in adult CP, *Slit2* is highly expressed but shows no significant change in expression in CP with reduced *Otx2*. Admittedly, there is a trend towards increased *Slit2* expression and we cannot exclude the potential for biological relevance. *Igf2* was significantly downregulated more than 2-fold in all CP. However, there were concomitant expression changes in IGF binding proteins, suggesting the level of *Igf2* activity could be maintained. Other factors influencing adult neurogenesis include amphiregulin (Falk & Frisén 2002), FGF2 (Hayamizu *et al.* 2001; Jin *et al.* 2003; Douet *et al.* 2013) and TGF- $\alpha$  (Tropepe *et al.* 1997), yet we found no change in expression (and no detectable expression of amphiregulin). TGF- $\beta$  negatively regulates adult neurogenesis (Wachs *et al.* 2006), and is downregulated in both CP of *Otx2-lox* mice (Table 4).

Stress response ontology is enriched in adult CP and differential expression of CP genes has been reported in chronically stressed rats (Sathyanesan *et al.* 2012). Of these previously reported genes, we found 3 genes with significantly reduced expression in treated *Otx2-lox* mice, and with a trend for downregulation in *Otx2-GFP* mice (Table 5). *Klotho* is implicated in aging (Kuro-o *et al.* 1997; Kurosu *et al.* 2005), PDGF $\alpha$  is a cilia protein, and 5HT<sub>2C</sub> is a serotonin receptor implicated in phosphoinositide turnover and cyclic GMP (Kaufman *et al.* 1995). We observe no expression of *BDNF*, *Epo*, *MMP9*, *5HT<sub>2A</sub>* and *TNF- $\alpha$*  in our mice, suggesting differential expression compared to rats (Sathyanesan *et al.* 2012). These results suggest that *Otx2* depletion might lead to premature aging and that acute *Otx2* knockdown is more deleterious than constitutive knockdown.

*Otx2 protein interactions*

To better understand Otx2 function in adult CP, we performed several Otx2 co-immunoprecipitation (co-IP) experiments with mass spectrometry (MS) analysis to identify potential protein partners. Comparison with above RNA sequencing analysis could eventually reveal underlying Otx2-dependent pathways in the CP. Furthermore, we previously identified non-cell autonomous Otx2 protein in subventricular zone (SVZ) and rostral migratory stream (RMS) astrocytes (Planques *et al.*, in preparation) and visual cortex (VCx) parvalbumin cells (Sugiyama *et al.* 2008). The identification of alternate protein partners in cell-autonomous and non-cell-autonomous contexts would suggest Otx2 takes on specific roles upon transfer between cells. In order to test this hypothesis, and to reinforce CP analysis, we also performed Otx2 co-IP on lysates from SVZ, RMS and VCx.

We used three criteria to obtain a list of potential Otx2 protein interactions in the four brain structures (Table S3): (i) unique proteins identified exclusively in Otx2 co-IP samples with more than 2 peptides (Unique protein,  $\geq 3$  peptides); (ii) enriched proteins identified with more than 2 peptides in Otx2 co-IP samples and having greater than two-fold enrichment compared to IgG co-IP (Enriched protein  $\geq 2$ ); and (iii) all small proteins ( $< 25$  kDa) exclusive to Otx2 co-IP samples regardless of peptide number (Unique protein  $< 25$  kDa). These lists were used for comparison between structures and ontology analysis. We also generated a list of high-confidence protein partners for Otx2 in CP selecting proteins identified with 10 or more peptides and greater than 3.5-fold enrichment compared to IgG co-IP (Table 6).

We cross-compared our data to previously identified Otx2 partners. One key partner during embryogenesis is *Meis2*, which is a co-activator for mesencephalon specification (Agoston & Schulte 2009). *Meis2* is expressed in CP at low levels (170 mean reads in 4<sup>th</sup> V CP; 31 mean reads in Lat V CP) as compared to Otx2 (5954 mean reads in 4<sup>th</sup> V CP and 6829 mean reads in Lat V CP) and appears not to be a major partner of Otx2 in CP. TLE4 is another identified protein partner of Otx2 during development and allows repression of mesencephalon fate (Heimbucher *et al.* 2007). While it has greater expression in CP (798 mean reads in 4<sup>th</sup> V CP and 689 mean reads in Lat V CP), TLE4 was not identified in our Otx2 co-IP. The absence of TLE4 suggests Otx2 protein interactions depend strongly on cell type and developmental context.

To identify potentially new Otx2 protein partners, we compared the lists from the four brain structures. Few proteins, 17 in total, were common to the three non-cell autonomous structures (Figure 4A, Table 7). Of these 17 common proteins, 8 proteins were also identified in CP. Of these common proteins, Fig4, Vac14 and Pikfyve are involved in endosome autophagy and trafficking, suggesting Otx2 plays a role in signal transduction. Given that these endosomes can give rise to secretory exosomes, interaction with Otx2 may reinforce its role in regulating pathways of extracellular protein expression identified in our RNA sequencing analysis.

In order to identify potential differences between cell autonomous and non-cell autonomous partners, we performed ontology analysis on Otx2 protein partners list for all structures (Figure 4B). No dramatic differences were found between structures, suggesting conserved role of Otx2 in cell autonomous and non-cell autonomous Otx2 target structures. Otx2 protein partners show enrichment in oxidative phosphorylation, RNA processing, binding or splicing, ribosome and spliceosome within all structures. Indeed, of the 27 proteins in common between SVZ and RMS, 15 of them are involved in splicing, suggesting a novel function for Otx2.

Regarding CP targets, we found enrichment of tight junction class, which was also identified in Otx2-lox knockdown, suggesting involvement of Otx2 both in gene regulation and cellular functions for CP maintenance. Finally, we performed pathway analyses to map potential Otx2 interacting networks for CP (Figure S1). These maps suggest involvement of Otx2 in chromatin remodeling, DNA repair, RNA processing, trafficking, cell adhesion and endosomes. Taken together, Otx2 appear to be implicated in the regulation of genomic landscape, the regulation and processing of RNA, the trafficking of signals, and the maintenance of cellular connections.



## Discussion

CP heterogeneity has been previously shown in embryo (Lun *et al.* 2015). We extend these findings by confirming CP heterogeneity in the adult. While CP in the different ventricles clearly have common functions, several genes are uniquely expressed in Lat V CP or in 4<sup>th</sup> V CP.

Otx2 is master regulator of CP and brain development but its role in adult CP is not well known. Through comprehensive RNA sequencing analysis in two *Otx2* knockdown mouse models, we have identified new potential functions for Otx2. We found upregulation of immune factors and deregulation of genes involved in cellular maintenance and junctions, suggesting altered CP function and disruption of CP barriers. *Otx2* constitutive knockdown shows similar disruption of cell maintenance pathway but no modification of immunity, suggesting that acute reduction of *Otx2* expression leads to stronger changes in CP expression. Moreover, fewer genes are deregulated in *Otx2* constitutive knockdown model, suggesting compensatory mechanisms. In addition, analysis of secreted factors shows more changes in gene expression after acute *Otx2* knockdown compared to constitutive knockdown. These factors impact embryonic and/or adult neurogenesis and suggest a role for *Otx2* in the regulation of adult neurogenesis. Several CP genes involved in neurogenesis have altered expression after *Otx2* knockdown, and 4<sup>th</sup> V CP seems more impacted as *BMP7* and *Tgm2* are significantly upregulated only in this CP. This might reflect a more important role of Otx2 in 4<sup>th</sup> V CP for the regulation of neurogenesis-related gene expression.

A protein interactome of Otx2 in adult retina has been reported recently (Fant *et al.* 2015). Similar to their observations, we find involvement of Otx2 in RNA processing, splicing and translation. Interestingly, this pathway was identified in both Otx2 cell-autonomous (CP) and non-cell-autonomous target structures (SVZ, RMS and VCx). Splicing targets of Otx2 must be identified in order to confirm co-IP experiments and CP might constitute a model as splicing related terms are enriched in adult CP, especially in the 4<sup>th</sup> V CP. In addition to potentially interacting with splicing machinery, our RNA sequencing analysis suggests that Otx2 might also regulate the expression of splicing factors in CP. Taken together, Otx2 appears to regulate CP cells at various levels: at the molecular level through chromatin

remodeling, DNA repair and RNA processing; and at the cellular level through trafficking, cell adhesion and endosomes.

## **Materials & Methods**

### *Ethic statement*

All animal procedures, including housing, were carried out in accordance with the recommendations of the European Economic Community (86/609/EEC), the French National Committee (87/848) and French bylaws (AGRG1240332A / AGRG1238724A / AGRG1238767A / AGRG1238729A / AGRG1238753A). For surgical procedures, animals were anesthetized with Xylazine (Rompun 2%, 5mg/kg) and Ketamine (Imalgene 500, 80mg/kg). For biochemical analysis, mice were sacrificed by cervical elongation. This research (project no. 00704.02) was approved by Ethics committee n° 59 of the French Ministry for Research and Higher Education.

### *Animals*

Otx2-lox mice were kindly donated by T. Lamonerie (Fossat *et al.* 2006) and Otx2-GFP mice were kindly donated by A. Simeone (Acampora *et al.* 2009). Three-month old Otx2-lox mice were injected with Cre-Tat or vehicle as described in Planques *et al.* (2016). After 15 days, animals were perfused transcardially with 20ml of 1X PBS and CP were dissected and processed for biochemical analysis.

### *Quantitative PCR analysis*

Total RNA from lateral or 4th ventricle CP were extracted by using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) with DNA removal. Total RNA (10 to 20 ng) was retrotranscribed by using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). Quantitative PCR analysis of cDNA (diluted at 1/10) were performed in triplicate with a LightCycler 480 II (Roche) using the SYBR Green I Master mix. After T<sub>m</sub> calling verification, gene-to-HPRT ratios were determined using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. For Otx2 expression analysis, expression was compared to mean expression of vehicle-injected mice of the same experiment.

### *RNA sequencing analysis*

RNA from five Cre-Tat icv injected mice were pooled (from mice having less than 50% Otx2 expression on average compared to control mice) while RNA from four vehicle-injected mice were pooled. For analysis of Otx2-GFP mice, the RNA was

extracted from pooled CP of 4 to 5 mice. PolyA+ mRNA purification, mRNA sequencing and data normalization was performed by the Genomic Paris Center (IBENS, Paris, France) using Illumina HiSeq 1500.

#### *Protein co-immunoprecipitation*

CP from Lat V and 4<sup>th</sup> V from 3 months old mice were pooled and lysed with 1 ml lysis buffer (100 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X protease/phosphatase inhibitor (Roche)) containing 1 µl of benzonase (Roche). CP were dissociated using 26G syringe and incubated 30 minutes on ice. Tubes were centrifuged at 21 000g for 10 min and supernatant was recovered and divided in two. Each half was incubated with 44 µg of either anti-Otx2 (ab21990, Abcam) or anti-IgG antibody (ab27478, Abcam) coupled magnetic-beads (10 mg/ml with 9.5 µg of antibody per mg of beads, Dynabeads Antibody Coupling Kit Life Tech) in lysis buffer at 4°C on rotating wheel overnight. Using magnetic separation, beads were washed 5 times in 1 mL of cold lysis buffer. Pelleted beads were eluted in 20 µl of laemmli buffer by heating 5 min at 95 °C, and then stored at -20 °C.

For SVZ and RMS, tissue from 10 mice were lysed by trituration (pipette and 26G syringe) in 10 µl lysis buffer II (20 mM Tris pH 8, 120 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycerol, 1X protease/phosphatase inhibitor) per mg of tissue supplemented with 1 µl of benzonase / 1mL of lysis buffer II. Samples were processed as described above with 25 µl of antibody coupled-beads. Pelleted beads were eluted in 30 µl of laemmli buffer.

#### *Mass spectrometry analysis*

Proteomics analysis were performed by the Protein Mass Spectrometry Laboratory (Institut Curie, Paris, France). Eluted samples in laemmli were processed and resulting peptides were analyzed by nano-LC-MS/MS using an Ultimate 3000 system (Dionex S.A.) coupled to an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Q-OT-qIT, Thermo Fisher Scientific). Data were acquired using Xcalibur software and the resulting Mascot files were further processed by using myProMS software after filtering for less than 0.5% estimated false discovery rate. For CP proteomics, three experiments were performed. For SVZ, RMS and VCx proteomics, one experiment was performed.

### *Ontology analysis*

Genes with > 10 mean reads in at least one of the CP samples were selected for ontology analysis. Differentially expressed gene lists were generated using threshold of  $p\text{-adj} < 0.05$ . Ontology term enrichment was analyzed with DAVID Bioinformatic resource v6.7 (Huang, Sherman & Lempicki 2009a; Huang, Sherman & Lempicki 2009b) and plotted as  $-\log_{10}$  scale of the enrichment p-values. UniProt (<http://www.uniprot.org>) was used for obtaining functional classes (Table 6) and interaction pathway maps (Figure S1). Gene list comparisons and Venn diagrams were generated with web-based tools (<http://www.bioinformatics.lu/venn.php>). Venn diagrams of MS GO analysis were generated with Prism 6 (GraphPad).

### **Acknowledgements**

This work was supported by Region Ile-de-France via le DIM Cerveau et pensée

## Figures

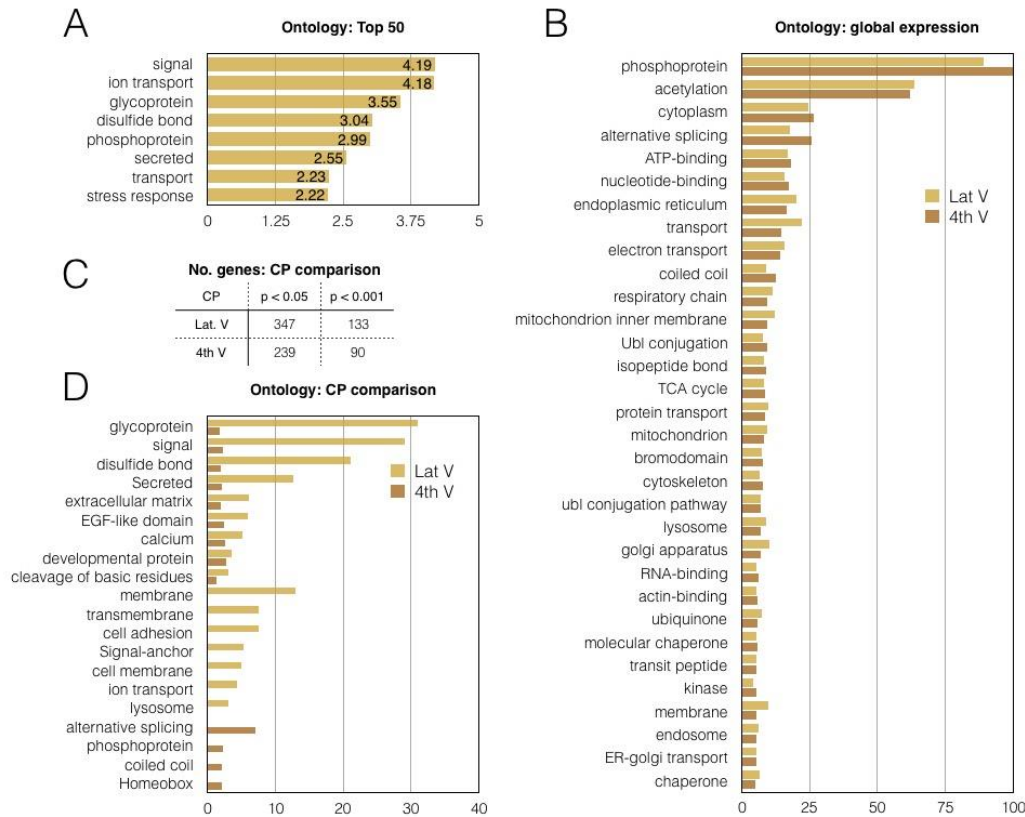


Figure 1. Gene expression analysis of choroid plexus in lateral and 4<sup>th</sup> ventricles.

(A) Ontology analysis of the 50 most expressed genes in combined CP from vehicle ivc injected Otx2-lox mice. Plotted terms have greater than 2-fold ontology enrichment. (B) Ontology analysis of global expression (> 10 mean reads) for each CP. Plotted terms have greater than 5-fold ontology enrichment. (C) The total number of genes obtained by differential expression analysis between Lat V CP and 4<sup>th</sup> V CP with different *p-adj* cut-off values. (D) Ontology analysis of differential expression analysis (cut-off at *p-adj* < 0.05). Plotted terms have greater than 2-fold ontology enrichment.

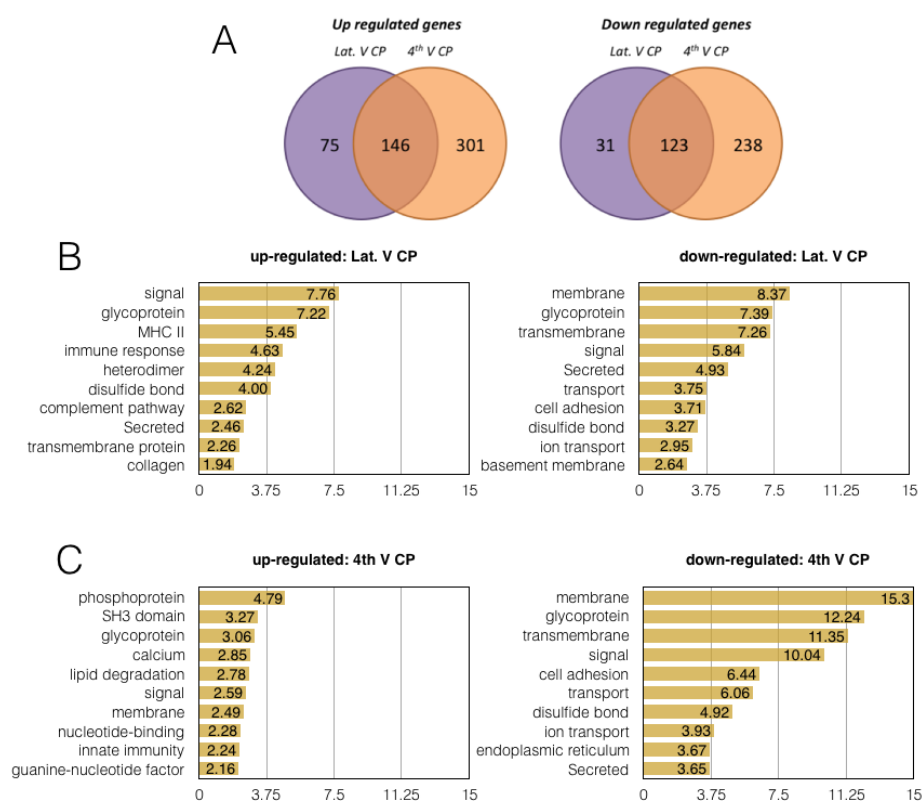
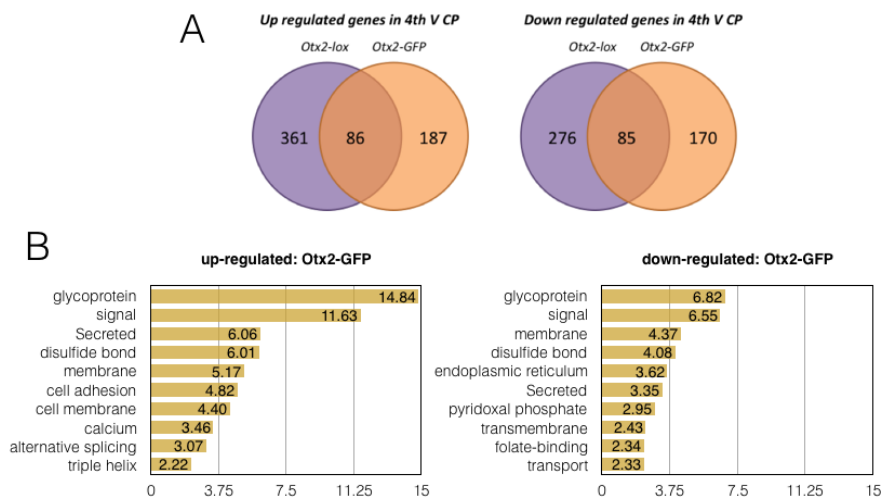


Figure 2. Changes in gene expression after *Otx2* knockdown in choroid plexus.

(A) Venn diagrams of the number of up- or down-regulated genes ( $p\text{-adj} < 0.05$ ) to compare overlap between Lat V CP and 4<sup>th</sup> V CP. (B) Ontology analysis of differentially regulated genes in Lat V CP. (C) Ontology analysis of differentially regulated genes in 4<sup>th</sup> V CP.



*Figure 3. Gene expression in choroid plexus of Otx2-GFP mice.*

(A) Venn diagrams of the number of up- or down-regulated genes ( $p\text{-adj} < 0.05$ ) to compare overlap between 4<sup>th</sup> V CP changes in Cre-Tat ivc injected Otx2-lox mice and Otx2-GFP mice. (B) Ontology analysis of differentially regulated genes in Otx2-GFP mice.



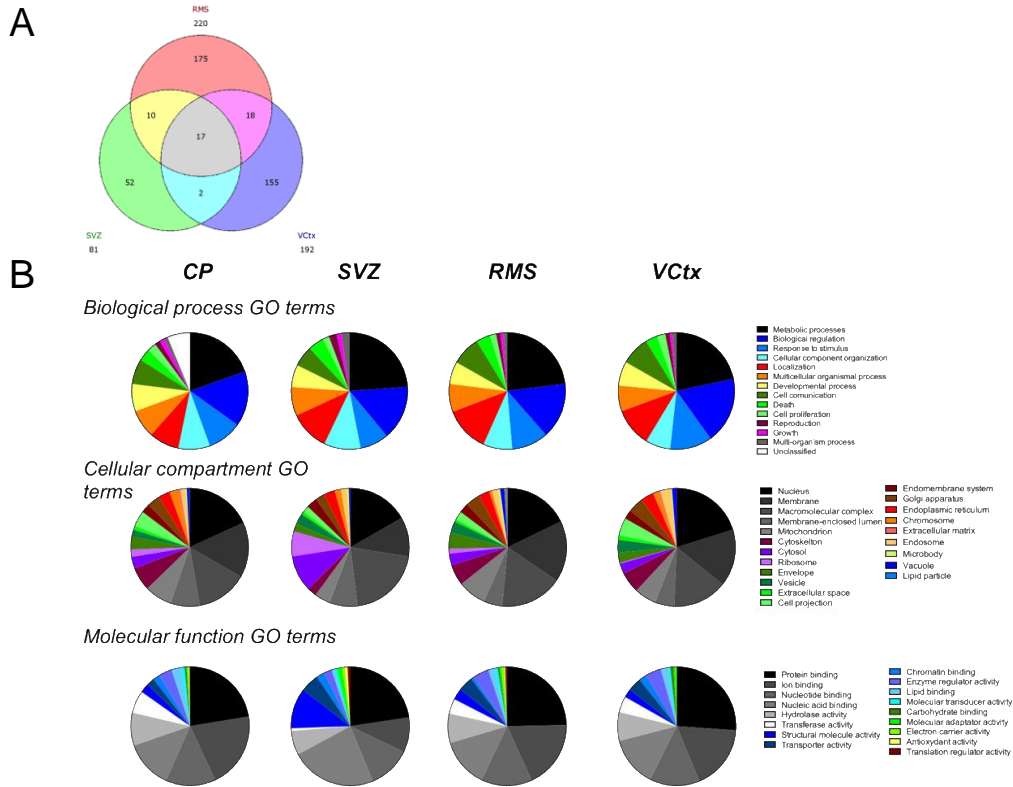


Figure 4. Distribution and classification of putative protein partners of *Otx2* across 4 brain structures.

(A) Venn diagram of the number of putative *Otx2* partners that overlap among the 3 non-cell autonomous structures. (B) Pie charts showing GO ontology classifications for the four brain structures.

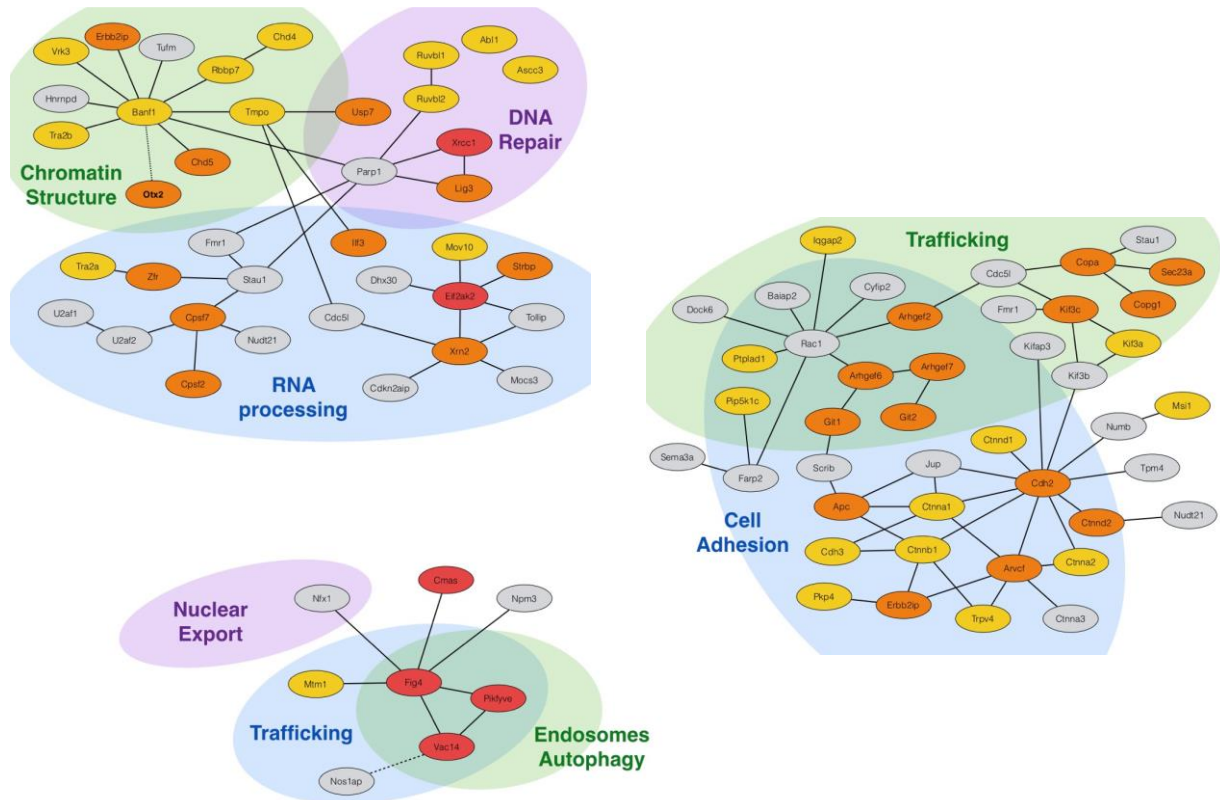


Figure S1. Protein interaction maps of putative Otx2 protein partners.

Analysis of known protein interactions (UniProt) reveals clustering of putative Otx2 partners. Color code is based on MS enrichment compared IgG co-IP: red, unique partners; orange, > 10-fold enrichment; yellow, > 5-fold enrichment; gray, > 3-fold enrichment.

**Tables**

*Table 1. Top 50 genes expressed in combined choroid plexus.*

MGI symbol	Mean reads	Mean reads 4 <sup>th</sup> V CP	Mean reads Lat V CP	Fold change	<i>p-adj</i>
Ttr	2623541.43	2348303.57	2898779.30	1.23	0.4700
Enpp2	593931.55	612769.48	575093.62	0.94	1.0000
Malat1	112726.25	157394.89	68057.62	0.43	0.1482
Apoe	64482.11	54599.66	74364.55	1.36	0.7231
Trpm3	39627.47	46150.05	33104.88	0.72	0.1606
Bsg	49354.09	41700.89	57007.28	1.37	0.5023
Kl	45044.23	40666.95	49421.51	1.22	0.4792
Abhd2	41094.30	36405.11	45783.49	1.26	0.2413
AYo36118	25992.16	33903.28	18081.03	0.53	1.0000
Slc4a10	30241.50	30563.40	29919.59	0.98	1.0000
Psap	33695.31	28767.54	38623.08	1.34	0.0646
Igfbp2	25336.28	28555.83	22116.74	0.77	0.4457
Hspa5	25425.51	24959.76	25891.25	1.04	1.0000
F5	25757.66	24672.29	26843.03	1.09	0.9813
Slc12a2	23868.93	24279.26	23458.59	0.97	1.0000
Ctsd	28199.82	23671.69	32727.95	1.38	0.0423
Prlr	27451.94	22727.75	32176.13	1.42	0.7565
Atp1a1	22895.76	22067.06	23724.47	1.08	1.0000
Clu	26746.86	21750.07	31743.64	1.46	0.0323
App	19290.01	21196.95	17383.08	0.82	0.4130
Cntn1	25888.01	21016.68	30759.34	1.46	0.0175
Atp2b3	20580.09	19744.88	21415.31	1.08	1.0000
Ahcyl2	20725.94	19426.99	22024.89	1.13	0.8161
Igf2	24978.47	18973.38	30983.55	1.63	0.0123
Hsp90b1	18815.66	18514.44	19116.89	1.03	1.0000
Sptbn1	18883.04	18275.86	19490.22	1.07	1.0000
Cpe	17182.20	17448.90	16915.50	0.97	1.0000
Car12	18529.42	17276.99	19781.85	1.14	0.7979
Clic6	16952.83	16432.24	17473.42	1.06	1.0000
Strip2	14776.49	16187.00	13365.99	0.83	0.4745
Timp3	18530.30	15561.81	21498.79	1.38	0.0292
Itpr1	16251.84	15546.31	16957.36	1.09	0.9741
Kcne2	13860.56	15416.34	12304.78	0.80	0.8581
Cgnl1	15182.58	15291.91	15073.25	0.99	1.0000
<b>Gpm6a</b>	22456.49	15180.99	29731.99	1.96	0.0000
Slc4a2	15501.32	14912.27	16090.37	1.08	1.0000
Atp5a1	15922.37	14766.26	17078.49	1.16	0.7456
Nsg2	15587.30	14668.85	16505.74	1.13	0.8949
Zbtb20	12599.65	14602.65	10596.65	0.73	0.5636
Stk39	14416.58	14506.96	14326.19	0.99	1.0000
Tmem72	14820.55	14343.24	15297.86	1.07	1.0000
Cab39l	15437.81	14310.93	16564.69	1.16	0.8214
Neddd4	15836.75	14271.56	17401.95	1.22	0.4738
Macf1	12704.45	14026.82	11382.08	0.81	0.5999
Vat1l	14589.28	13982.94	15195.61	1.09	1.0000
Hsp90ab1	14367.66	13756.36	14978.96	1.09	1.0000
Calr	13888.82	13606.17	14171.47	1.04	1.0000
Htr2c	13453.29	13342.50	13564.09	1.02	1.0000
Slc5a3	11648.04	13281.46	10014.62	0.75	0.0914
Sptan1	11913.10	13160.95	10665.26	0.81	0.3292

Table 2. Spatial gene expression enrichment.

Gene	Fold change	<i>p-adj</i>
<i>25 most enriched genes in lateral ventricle CP</i>		
Emx2 <sup>a</sup>	infinite <sup>b</sup>	0.00000
Six3os1 <sup>a</sup>	infinite <sup>b</sup>	0.00000
Dmrta2 <sup>a</sup>	8.34	0.00000
Dmrt3 <sup>a</sup>	7.06	0.00000
<b>Nrn1<sup>a</sup></b>	6.31	0.00000
Crabp1	6.00	0.00000
Alx3 <sup>a</sup>	4.70	0.00013
Otx1 <sup>a</sup>	4.50	0.00000
Slc17a8	4.48	0.00000
9330132A10Rik	4.14	0.00003
Rbm24	3.58	0.00000
Slc6a17	3.52	0.00000
<b>Dazl</b>	3.46	0.00000
Tnc	3.32	0.00001
Adra2c	3.29	0.00000
Cd44	3.29	0.00000
Optc	3.27	0.00001
Sptlc3	2.81	0.00000
Tenm2	2.75	0.00000
Kcnab1	2.57	0.00000
Dscaml1	2.55	0.00017
Cpn1	2.43	0.00000
Cacna1h	2.39	0.00000
Nyap2	2.27	0.00000
Tmem28	2.24	0.00023
<i>25 most enriched genes in 4th ventricle CP</i>		
Hoxb2 <sup>a</sup>	infinite <sup>b</sup>	0.00001
Lmx1b <sup>a</sup>	83.34	0.00000
Dlk1	33.54	0.00000
Gm15051	23.35	0.00000
Gdf7 <sup>a</sup>	22.58	0.00000
En2 <sup>a</sup>	22.43	0.00000
Tmprss6	20.54	0.00000
Cnpy1 <sup>a</sup>	19.31	0.00000
Meis1 <sup>a</sup>	12.73	0.00000
Tbc1d1	10.31	0.00000
Gfra1 <sup>a</sup>	10.04	0.00000
Gm853	7.08	0.00000
Cidea	6.54	0.00000
Chmp4c	6.44	0.00000
Slc01a6	6.04	0.00000
Meis2	5.45	0.00000
Slc47a1	5.39	0.00000
Thsd4 <sup>a</sup>	4.73	0.00000
Gnal	4.68	0.00000
Gabre	4.57	0.00000
<b>Ntn1</b>	4.40	0.00000
9330101J02Rik	4.14	0.00000
Cysltr1	3.98	0.00000
Elovl5	3.94	0.00000
Pde10a	3.86	0.00000

<sup>a</sup> genes also enriched in relevant embryo choroid plexus<sup>b</sup> transcript was undetected in one region

*Table 3. Top 10 differentially expressed genes in Otx2-lox mice.*

MGI symbol	Mean reads vehicle	Mean reads Cre-Tat	Fold change	<i>p</i> -adj
<i>Up-regulated in lateral ventricle CP</i>				
Igkv1-135	0.55	33.39	61.02	0.00000
Slc1a6	2.13	82.32	38.71	0.00000
Mup5	122.97	4119.36	33.50	0.00000
Gpx3	294.53	7229.24	24.55	0.00000
Ighv1-67	1.64	36.35	22.14	0.00000
Saa3	2.19	47.39	21.65	0.00000
Tnfrsf11b	6.29	115.75	18.42	0.00000
Cacnb3	24.19	324.98	13.44	0.00000
Ndnf	88.77	1097.98	12.37	0.00000
Gm4841	3.80	43.75	11.51	0.00000
<i>Down-regulated in lateral ventricle CP</i>				
Ngfr	444.17	83.23	-5.34	0.00000
Nrn1	1923.63	495.95	-3.88	0.00000
B3galt2	109.09	30.64	-3.56	0.00070
Dazl	207.10	60.18	-3.44	0.00000
Itga10	183.61	53.72	-3.42	0.00001
Slc26a7	1670.15	532.76	-3.13	0.00000
Steap1	2223.53	735.40	-3.02	0.00000
Defb11	473.13	168.88	-2.80	0.00000
Entpd3	240.09	87.08	-2.76	0.00006
Ccl9	2037.10	774.06	-2.63	0.00000
<i>Up-regulated in 4th ventricle CP</i>				
9030619Po8Rik	0.00	28.57	infinite	0.00002
Tmigd1	0.00	33.08	infinite	0.00000
A730020M07Rik	1.25	75.98	60.60	0.00000
Gpx3	181.28	10779.69	59.46	0.00000
Cacnb3	17.99	778.46	43.27	0.00000
Mup5	25.56	1052.70	41.18	0.00000
Fmod	285.91	8687.84	30.39	0.00000
Slitrk6	4.71	125.19	26.58	0.00000
Ndnf	83.58	2069.67	24.76	0.00000
Adcy8	10.34	233.05	22.54	0.00000
<i>Down-regulated in 4th ventricle CP</i>				
Ngfr	683.90	158.78	-4.31	0.00000
Steap1	1224.64	326.15	-3.75	0.00000
Elfn1	104.01	28.37	-3.67	0.00002
Gnmt	121.85	33.27	-3.66	0.00001
Gm22650	141.35	40.45	-3.49	0.00000
Mir448	94.83	27.77	-3.41	0.00020
Igf2os	88.59	26.21	-3.38	0.00053
B3galt2	140.66	44.22	-3.18	0.00002
Slc26a7	843.43	271.38	-3.11	0.00000
Crhr2	504.22	163.84	-3.08	0.00000

Table 4. Expression of secreted factors in Otx2 CP knockdown experiments.

Gene	CP	Mean reads control	Mean reads knockdown	Fold change	p-adj
Bmp7	Otx2-lox Lat V CP	5124.74	7090.08	1.38	0.18445
	Otx2-lox 4th V CP	2547.29	4035.79	1.58	0.00140
	Otx2-GFP 4th V CP	2215.14	2261.21	1.02	1.00000
Wnt2b	Otx2-lox Lat V CP	10.09	66.23	6.57	0.00019
	Otx2-lox 4th V CP	12.10	65.67	5.43	0.00007
	Otx2-GFP 4th V CP	29.04	34.69	1.19	1.00000
Tgm2	Otx2-lox Lat V CP	275.58	421.63	1.53	0.24956
	Otx2-lox 4th V CP	138.49	264.52	1.91	0.00399
	Otx2-GFP 4th V CP	387.77	404.29	1.04	1.00000
Shh	Otx2-lox Lat V CP	0.00	1.37	infinite	1.00000
	Otx2-lox 4th V CP	0.69	4.59	6.64	1.00000
	Otx2-GFP 4th V CP	0.00	63.86	infinite	0.00000
Slit2	Otx2-lox Lat V CP	2302.34	2673.52	1.16	1.00000
	Otx2-lox 4th V CP	3470.73	4803.44	1.38	0.71590
	Otx2-GFP 4th V CP	4323.01	6098.80	1.41	0.64874
Fgf2	Otx2-lox Lat V CP	140.40	123.14	0.88	1.00000
	Otx2-lox 4th V CP	63.64	84.00	1.32	0.98782
	Otx2-GFP 4th V CP	66.90	65.98	0.99	1.00000
Areg	Otx2-lox Lat V CP	0.00	0.88	infinite	1.00000
	Otx2-lox 4th V CP	NA	NA	NA	NA
	Otx2-GFP 4th V CP	0.00	0.00	NA	NA
TGF- $\alpha$	Otx2-lox Lat V CP	2140.03	1424.51	0.67	0.06201
	Otx2-lox 4th V CP	1356.50	999.44	0.74	0.16105
	Otx2-GFP 4th V CP	1039.62	1672.92	1.61	0.21629
TGF- $\beta$ 2	Otx2-lox Lat V CP	9232.77	4747.14	0.51	0.00000
	Otx2-lox 4th V CP	3754.99	2169.15	0.58	0.00004
	Otx2-GFP 4th V CP	3323.64	2563.34	0.77	0.36017
Igf2	Otx2-lox Lat V CP	42336.27	19143.87	0.45	0.00075
	Otx2-lox 4th V CP	18716.99	8086.73	0.43	0.00000
	Otx2-GFP 4th V CP	42542.20	17197.34	0.40	0.00000
Igfbp2	Otx2-lox Lat V CP	30195.19	20992.24	0.70	0.32554
	Otx2-lox 4th V CP	28165.89	13235.08	0.47	0.00025
	Otx2-GFP 4th V CP	47528.85	21660.37	0.46	0.00000
Igfbp7	Otx2-lox Lat V CP	6127.57	8331.33	1.36	0.94383
	Otx2-lox 4th V CP	3663.13	5362.11	1.46	0.01782
	Otx2-GFP 4th V CP	10013.92	9927.87	1.46	1.00000

*Table 5. Expression of behavioral stress factors in Otx2 CP knockdown experiments.*

Gene	CP	Mean reads control	Mean reads knockdown	Fold change	p-adj
Klotho	Otx2-lox Lat V CP	67521.59	43117.39	0.64	0.01011
	Otx2-lox 4th V CP	40100.52	21213.58	0.53	0.00000
	Otx2-GFP 4th V CP	44963.70	37576.48	1.20	0.76571
5HT2C	Otx2-lox Lat V CP	18528.82	9417.12	0.51	0.00000
	Otx2-lox 4th V CP	13157.33	5578.96	0.42	0.00000
	Otx2-GFP 4th V CP	8954.92	7270.15	1.23	0.62596
PDGFR $\alpha$	Otx2-lox Lat V CP	5300.63	2879.64	0.54	0.00006
	Otx2-lox 4th V CP	3357.57	1338.94	0.40	0.00000
	Otx2-GFP 4th V CP	3610.57	3136.77	1.15	1.00000

Table 6. High confidence putative Otx2 protein partners in CP identified by MS analysis.

Gene	Function	Gene	Function	Gene	Function
Abcd3		Farsa		Plekhg3	
Abcf1		Fig4	Trafficking	Prpf4b	RNA processing
Abl1	Trafficking, Cell adhesion	Git1	Trafficking, Cell adhesion	Prpsap1	Metabolism
Acot11	Metabolism	Git2	Trafficking, Cell adhesion	Prrc2c	
Actr1a	Trafficking	Gja1	Cell adhesion	Ptdss1	
Adsl	Metabolism	Gnb2	Signaling	ptplad1	Trafficking, Signaling
Ahctf1	Nuclear Export	Gpam	Metabolism	Purg	
Aifm1	Translation	Gprasp1	Trafficking	Rab10	Trafficking
Alg2	Metabolism	Grsf1	RNA binding	Rbbp7	Chromatin structure
Angptl2	Secreted	Gtf3c2	Transcription	Rbm10	RNA binding
Ap1m1	Trafficking	Gtpbp1	RNA binding	Rbm26	RNA binding
Apc	Cell adhesion	Hdlbp	Metabolism	Rbm27	RNA binding
Arhgap39		Hist1h1b	Chromatin struct., Epigenetics	Rhot1	Trafficking
Arhgef17		Hnrnp11	RNA binding	Rpl36	
Arhgef2	Trafficking, Cell adhesion	Hras	Signaling	Ruvbl1	Transcription, DNA repair
Arhgef6	Trafficking, Cell adhesion	Hsp90aa1	Signaling	Ruvbl2	Transcription, DNA repair
Arhgef7	Trafficking, Cell adhesion	Hspa12a		Sbf1	
Arvcf	Cell adhesion	Ilf3	Translation	Sec23a	Trafficking
Ascc3	DNA repair	Iqgap2	Trafficking	Shank3	Cytoskeleton
Atp5f1	Metabolism	Kif3a	Trafficking	Shroom3	Cell adhesion, Cytoskeleton
Atp5h	Metabolism	Kif3c	Trafficking	Slc27a1	
Atxn2	Trafficking	Kras	Signaling	Sltm	Transcription
Banf1	Chromatin structure	lap2a	Chromatin structure	Smchd1	Epigenetics
Cdh2	Cell adhesion	lap2b	Chromatin structure	Son	RNA processing, Transcription
Cdh3	Cell adhesion	Larp4	Cytoskeleton	Spats2	
Chd4	Chromatin structure	Larp7	Transcription	Srpk1	RNA processing, Signaling
Chd5	Chromatin structure	Lig3	DNA repair	Srpk2	RNA processing, Signaling
Clasp1	Cytoskeleton	Lrch2		Strap	RNA processing, Signaling
Cmas	Trafficking	Luc7l2	RNA binding	Strbp	RNA binding, Translation
Copa	Trafficking	Map1a	Cytoskeleton	Suclg1	Metabolism
Copg1	Trafficking	Map7d1		Tenc1	Cytoskeleton, Signaling
Cpsf2	RNA processing	Mapkap1	Signaling	Tfam	Transcription
Cpsf7	RNA processing	Mast4		Tfb1m	RNA processing, Transcription
Cpt1a	Metabolism	Mlycd	Metabolism	Tjp2	Cell adhesion
Cpt1b	Metabolism	Mov10	RNA processing	Toe1	Neurogenesis
Ctnna1	Cell adhesion	Mrpl11		Tom12	Trafficking, Signaling
Ctnna2	Cell adhesion	Msi1	RNA binding, Translation	Trim28	Chromatin struct., Epigenetics
Ctnnb1	Cell adhesion	Mtch1		Trim3	Trafficking
Ctnnd1	Cell adhesion	Mtch2		Trim56	
Ddost		Mtm1	Trafficking	Triobp	Cytoskeleton
Ddx46	RNA processing	Mtmr10		Trpv4	Cell adhesion
Ddx50	RNA binding	Mycbp2	Transcription	U2surp	RNA processing
Ddx6	RNA processing	Myef2	Transcription	Usp7	DNA repair
Dhx36	RNA processing	Myo10	Trafficking	Vac14	Trafficking
Dido1	Transcription	Nat10	Chromatin struct., Epigenetics	Vapa	Trafficking
Dlg3	Signaling	Nemf	Nuclear Export	Vrk3	Signaling
Dlgap4	Signaling	Nfatc2	Nuclear Export	Wdr70	
Dnaja3	Signaling	Nras	Signaling	Xrcc1	DNA repair
Eif2ak2	Nuclear export, Signaling	Otx2	Transcription	Xrn2	RNA processing
Eif4g1	Translation	Pikfyve	Trafficking	Zbtb20	Transcription
Eif4g3	Translation	Pip5k1a	Trafficking, Cell adhesion	Zc2hc1a	Transcription
Enpp2	Secreted	Pip5k1b	Trafficking, Cell adhesion	Zcchc6	RNA processing
Eprs	RNA processing	Pitpnm1	Trafficking	Zfr	RNA binding
erbb2ip	Cell adhesion	Pitpnm2	Trafficking		
Fam98a		Pkp4	Cell adhesion		



*Table 7. Highly enriched putative protein partners of non-cell autonomous Otx2.*

Protein	SVZ		RMS		Visual cortex		Choroid plexus	
	Otx2 co-IP	IgG co-IP	Otx2 co-IP	IgG co-IP	Otx2 co-IP	IgG co-IP	Otx2 co-IP	IgG co-IP
Acin1	4	0	20	3	33	10		
<b>Acot11</b>	3	0	8	0	17	3	25	1
<b>Arcn1</b>	5	2	12	5	8	4	22	0
<b>Copg1</b>	9	3	14	7	17	8	1	26
<b>Ddx46</b>	71	0	88	2	77	5	31	10
Dhx15	5	1	12	6	28	13		
<b>Fig4</b>	42	0	43	0	54	0	38	0
Kend3	8	0	11	0	10	0		
<b>Pikfyve</b>	82	0	67	0	125	0	80	0
Pnn	4	0	6	0	4	0		
<b>Rbm25</b>	11	0	16	2	23	5	12	6
<b>Sf3a1</b>	4	1	19	6	27	9	4	1
<b>Slc1a4</b>	7	3	12	6	19	7	7	3
Snrmp200	9	0	27	3	68	29		
Snrpd2	2	0	3	1	5	2		
Thoc2	3	0	7	0	6	0		
<b>Vac14</b>	86	2	89	4	113	0	63	0

*Table S1. Expression of adult choroid plexus genes with known spatial heterogeneity.*

Gene	Mean read 4th V CP	Mean reads Lat V CP	<i>p-adj</i>
Penk	9.1	17.2	0.9436
Sod3	3784.6	2045.7	0.0177
Ttr	234803.6	2898779.3	0.4700

*Table S2. Genes with significant expression changes in all choroid plexus knockdown experiments.*

Up regulated	Down regulated
1110017D15Rik	Aqp1
1810041L15Rik	Atp2b4
9330101J02Rik	B3galt2
Adora1	Elfn1
Arrb1	Entpd3
Atp1a2	Fam132a
Cadm1	Igf2
Cd55	Ins2
Chn2	Kalrn
Col11a1	Klhl36
Col1a2	Mapk9
Edn3	Myo5b
Eva1a	Myrip
Fam211b	Nav3
Fgf1	Pcnx
Flrt1	Pitpnm1
Fmod	Pomgnt1
Gda	Rcn1
Gpx3	Scg5
Hopx	Sfrp1
Layn	Slc29a4
Lrrc18	Slc2a12
Mapk10	Slc35f1
Matn2	Slc41a2
Megf11	Stra6
Mlc1	Tbc1d2
Mup5	Tbcd
Ndnf	Thumpd3
Ndr3	Tmem255b
Otx2	Tmprss11a
Pi15	Tspan33
Plin4	Ttr
Rufy4	Wdr17
Sel13	
Sema5a	
Sncg	
Sned1	
Sorcs2	
Sorl1	
Sulf2	
Tm4sf1	
Vim	
Vwa5b1	

*Table S3. Summary of protein lists and criteria for identification of putative Otx2 protein partners.*

List	Choroid plexus	SVZ	RMS	Visual cortex
Total proteins Otx2	3157	1959	2559	2705
Total proteins IgG	2561	1320	2427	2629
Unique proteins Otx2 ( $\geq 3$ peptides)	461	26	36	28
Unique proteins IgG ( $\geq 3$ peptides)	279	149	19	23
Enriched proteins Otx2 ( $\geq 2$ -fold)	763	135	28	129
Enriched proteins IgG ( $\geq 2$ -fold)	29	180	489	139
Unique small proteins Otx2 ( $< 25$ kDa)	115	27	50	35
Total Otx2 partners	1344 of 3157	81 of 1959	220 of 2559	192 of 2705

## References

- Acampora, D. *et al.*, 2009. Selective inactivation of Otx2 mRNA isoforms reveals isoform-specific requirement for visceral endoderm anteriorization and head morphogenesis and highlights cell diversity in the visceral endoderm. *Mechanisms of development*, 126(10), pp.882–897.
- Agoston, Z. & Schulte, D., 2009. Meis2 competes with the Groucho co-repressor Tle4 for binding to Otx2 and specifies tectal fate without induction of a secondary midbrain-hindbrain boundary organizer. *Development*, 136(19), pp.3311–3322.
- Beby, F. & Lamonerie, T., 2013. The homeobox gene Otx2 in development and disease. *Experimental eye research*, 111, pp.9–16.
- Bernard, C. *et al.*, 2014. Graded Otx2 activities demonstrate dose-sensitive eye and retina phenotypes. *Human molecular genetics*, 23(7), pp.1742–1753.
- Bjornsson, C.S. *et al.*, 2015. It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Developmental Cell*, 32(4), pp.435–446.
- Douet, V. *et al.*, 2013. Fractone-heparan sulphates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone. *Cell Proliferation*, 46(2), pp.137–145.
- Falk, A. & Frisé, J., 2002. Amphiregulin is a mitogen for adult neural stem cells. *Journal of Neuroscience Research*, 69(6), pp.757–762.
- Fant, B. *et al.*, 2015. Comprehensive interactome of Otx2 in the adult mouse neural retina. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 53(11), pp.685–694.
- Fossat, N. *et al.*, 2006. Temporal and spatial delineation of mouse Otx2 functions by conditional self-knockout. *EMBO reports*, 7(8), pp.824–830.
- Hayamizu, T.F., Chan, P.T. & Johanson, C.E., 2001. FGF-2 immunoreactivity in adult rat ependyma and choroid plexus: responses to global forebrain ischemia and intraventricular FGF-2. *Neurological research*, 23(4), pp.353–358.
- Heimbucher, T. *et al.*, 2007. Gbx2 and Otx2 interact with the WD40 domain of Groucho/Tle corepressors. *Molecular and cellular biology*, 27(1), pp.340–351.
- Hoch, R.V. *et al.*, 2015. OTX2 Transcription Factor Controls Regional Patterning within the Medial Ganglionic Eminence and Regional Identity of the Septum. *Cell reports*, 12(3), pp.482–494.
- Hu, H., 1999. Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron*, 23(4), pp.703–711.
- Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A., 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1), pp.1–13.

- Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A., 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), pp.44–57.
- Jin, K. *et al.*, 2003. Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging cell*, 2(3), pp.175–183.
- Johansson, P.A. *et al.*, 2013. The transcription factor Otx2 regulates choroid plexus development and function. *Development*, 140(5), pp.1055–1066.
- Kaufman, M.J., Hartig, P.R. & Hoffman, B.J., 1995. Serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor stimulates cyclic GMP formation in choroid plexus. *Journal of neurochemistry*, 64(1), pp.199–205.
- Kratzer, I. *et al.*, 2013. Developmental changes in the transcriptome of the rat choroid plexus in relation to neuroprotection. *Fluids and barriers of the CNS*, 10(1), p.25.
- Kuro-o, M. *et al.*, 1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390(6655), pp.45–51.
- Kurosu, H. *et al.*, 2005. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5742), pp.1829–1833.
- lehtinen, M.K. *et al.*, 2011. The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron*, 69(5), pp.893–905.
- lehtinen, M.K. *et al.*, 2013. The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. *The Journal of neuroscience*, 33(45), pp.17553–17559.
- Lun, M.P. *et al.*, 2015. Spatially Heterogeneous Choroid Plexus Transcriptomes Encode Positional Identity and Contribute to Regional CSF Production. *The Journal of neuroscience*, 35(12), pp.4903–4916.
- Marques, F. *et al.*, 2011. Transcriptome signature of the adult mouse choroid plexus. *Fluids and barriers of the CNS*, 8(1), p.10.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T. *et al.*, 2004. Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *The Journal of neuroscience*, 24(6), pp.1497–1506.
- Prochiantz, A. & Di Nardo, A.A., 2015. Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. *Neuron*, 85(5), pp.911–925.
- Rezsohazy, R., 2014. Non-transcriptional interactions of Hox proteins: inventory, facts, and future directions. *Developmental dynamics*, 243(1), pp.117–131.
- Samuel, A. *et al.*, 2014. Otx2 ChIP-seq Reveals Unique and Redundant Functions in the Mature Mouse Retina T. Langmann, ed. *PloS one*, 9(2), p.e89110.
- Sathyanesan, M. *et al.*, 2012. A molecular characterization of the choroid plexus and stress-induced gene regulation. *Translational psychiatry*, 2, p.e139.

- Saunders, N.R. *et al.*, 2015. Influx mechanisms in the embryonic and adult rat choroid plexus: a transcriptome study. *Frontiers in neuroscience*, 9, p.123.
- Sawamoto, K. *et al.*, 2006. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5761), pp.629–632.
- Spatazza, J. *et al.*, 2013. Choroid-plexus-derived otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell reports*, 3(6), pp.1815–1823.
- Sugiyama, S. *et al.*, 2008. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell*, 134(3), pp.508–520.
- Tropepe, V. *et al.*, 1997. Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *The Journal of neuroscience*, 17(20), pp.7850–7859.
- Wachs, F.-P. *et al.*, 2006. Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65(4), pp.358–370.
- Ziegler, A.N. *et al.*, 2012. IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 30(6), pp.1265–1276.

### IV- 3. Conclusion

Cette première étude nous a permis de confirmer la spécialisation des PC adultes pour la sécrétion du LCS. L'analyse transcriptomique des PC issus des souris contrôles a montré un enrichissement des fonctions de transport des ions, de la signalisation, du métabolisme énergétique et de l'épissage. Ces données vont dans le sens des données publiées sur les PC. En effet, la sécrétion du LCS, qui a des rôles dans la signalisation du système nerveux central, requiert une machinerie de transporteurs ioniques et une forte consommation énergétique (Lun, Monuki, *et al.* 2015). L'épissage dans les PC a déjà été décrit (Saito *et al.* 2014), et nos données suggèrent un fort enrichissement de l'expression des composants de la machinerie d'épissage dans le PC du 4<sup>e</sup> ventricule. La comparaison entre les PC des ventricules latéraux et celui du 4<sup>e</sup> ventricule a mis en évidence que l'hétérogénéité des PC, observée en embryonnaire (Lun, Johnson, *et al.* 2015), est maintenue chez l'adulte. Le knockdown conditionnel d'*Otx2* dans les PC a révélé la perturbation de l'expression de gènes impliqués dans l'immunité et l'adhésion cellulaire. L'ensemble de ces données pourrait être révélateur d'une dysfonction des PC, entraînant une diminution de l'adhésion cellulaire qui permettrait le passage de cellules immunitaires (Kaur *et al.* 2016). Ce knockdown d'*Otx2* entraîne également la dérégulation de gènes impliqués dans des fonctions clés des PC, comme le transport des ions ou la signalisation. De nombreux facteurs impliqués dans la régulation de la neurogenèse sont différentiellement exprimés et pourraient modifier ce processus. L'expression de *Klotho*, impliquée dans le vieillissement (Kurosu *et al.* 2005; Kuro-o *et al.* 1997), est diminuée après knockdown et suggère davantage l'effet délétère de la diminution aiguë d'*Otx2*. Dans le modèle de knockdown constitutif d'*Otx2*, on observe moins de dérégulations géniques que dans le modèle de knockdown conditionnel d'*Otx2*, et elles sont similaires sauf celles concernant l'immunité. Cette différence pourrait être due à une compensation des mécanismes d'adhésion chez la souris knockdown constitutif. La recherche de partenaires protéiques d'*Otx2* dans les PC a montré un enrichissement des protéines impliquées dans le métabolisme énergétique, qui est particulièrement important pour les fonctions des PC. Nous avons également confirmé l'implication potentielle d'*Otx2* dans la formation des



protéines, de la transcription à la traduction. Otx2 est notamment associée à la machinerie d'épissage, ce qui renforce l'hypothèse d'un rôle commun aux homéoprotéines (Holst *et al.* 2007).

## **V- Résultats Partie 2.**

### **Régulation de la neurogenèse adulte par Otx2**



## V- 1. Introduction

L'homéoprotéine Otx2 intervient à différentes étapes du développement embryonnaire du système nerveux central et reste exprimée dans certaines régions chez l'adulte. Les homéoprotéines peuvent transférer entre les cellules permettant une signalisation à longue distance, et de l'Otx2 non-cellulaire-autonome régule la plasticité du cortex visuel postnatal et adulte (Prochiantz & Di Nardo 2015). *Otx2* contrôle la neurogenèse embryonnaire non seulement de manière cellulaire-autonome, mais aussi en régulant l'expression de facteurs dans les PC. Ainsi, Otx2 pourrait réguler la neurogenèse adulte (Urbán & Guillemot 2014). De nombreux nouveaux neurones sont intégrés dans le BO chez la souris adulte. Les précurseurs de ces neurones sont localisés dans la ZSV, ce qui implique la migration des progéniteurs jusqu'au BO (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009). La neurogenèse adulte est régulée par les niches de la ZSV et du CMR qui sont constituées de cellules non progénitrices, de la MEC, et d'autres structures plus éloignées, tels les PC (Bjornsson *et al.* 2015).

Dans cette seconde étude, nous nous sommes intéressés au rôle d'Otx2 dans la neurogenèse adulte. Nous avons utilisé deux paradigmes expérimentaux pour quantifier la prolifération cellulaire et la formation de nouveaux neurones dans le BO. Cette étude a été réalisée sur le modèle murin de knockdown conditionnel d'*Otx2* dans les PC. Afin d'évaluer le rôle du transfert d'Otx2 dans la régulation de la neurogenèse adulte, nous avons étudié la formation des nouveaux neurones dans le modèle murin scFv-Otx2 pour induire l'expression d'un anticorps scFv qui bloque Otx2 dans le LCS. Nous avons également étudié le transfert d'Otx2 dans la ZSV et le CMR par immunoprécipitation et immunomarquage. Enfin, nous avons réalisé des RT qPCR afin d'étudier l'expression des molécules de la MEC produites par les astrocytes de la ZSV. Les questions développées dans cette étude sont:

- *Otx2* est-il un régulateur de la neurogenèse adulte ?
- Le transfert d'Otx2 permet-il de réguler la neurogenèse adulte ?
- Quel rôle remplit Otx2 dans la ZSV ?

## V- 2. Publication à soumettre

### **Choroid plexus *Otx2* regulates adult subventricular zone neurogenesis**

Anabelle Planques, Chantal Dubreuil, Alain Prochiantz, Ariel A Di Nardo\*

Centre for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), Collège de France, CNRS UMR 7241/INSERM U1050, PSL Research University, Paris, France

\*corresponding author: ariel.dinardo@college-de-france.fr

#### **Abstract**

Adult neurogenesis in the subventricular zone and subsequent migration of progenitor cells to the olfactory bulb are maintained by a microenvironment that is generated in part by supporting cells such as astrocytes. This neurogenic niche can also be influenced by factors originating from local vasculature and from cerebrospinal fluid produced by the choroid plexus. We find that *Otx2* homeoprotein, which is secreted by choroid plexus, transfers to the supporting cells of the subventricular zone and rostral migratory stream. Deletion of *Otx2* in choroid plexus reduces olfactory bulb newborn neurons and modifies extracellular matrix components produced by astrocytes. By expressing secreted single-chain antibodies to sequester *Otx2* in the cerebrospinal fluid, we obtained a similar decrease in olfactory bulb newborn neurons, reinforcing the implication of *Otx2* non-cell autonomous activity. Taken together, these results suggest that *Otx2* transfers to astrocytes to regulate the neurogenic microenvironment and influence progenitor cell migration.

## Introduction

Neurogenesis in the adult mouse brain provides continuous replacement of interneurons in olfactory bulbs (OB) and is important for olfaction-based learning (Lledo & Valley 2016). Precursor cells, located in the adult subventricular zone (aSVZ) lining the lateral cerebral ventricles, give rise to progenitor cells (neuroblasts) that migrate through the rostral migratory stream (RMS) to reach the OB where they differentiate as interneurons and integrate into the network. The RMS is composed of a compacted neuroblast network forming chains that migrate along blood vessels and are surrounded by astrocytic process (Lois *et al.* 1996; Whitman *et al.* 2009). While it is clear that RMS-associated astrocytes interact with neuroblasts (Kaneko *et al.* 2010), the role of astrocytes for neuroblasts migration is not known. Astrocytes are also located in the aSVZ and are thought to play a role as supporting cells for regulating the neurogenic niche microenvironment. The niche is further influenced by extrinsic factors coming from local vasculature and the cerebrospinal fluid (CSF). Furthermore, quiescent precursors interact directly with both vasculature and CSF (Bjornsson *et al.* 2015). Indeed, it has been shown that molecules within the CSF can control aSVZ neurogenesis by regulating cell proliferation or migration (Sawamoto *et al.* 2006; lehtinen *et al.* 2013).

Homeoproteins are key regulators of neurogenesis both during embryogenesis and adult neurogenesis (Prochiantz & Di Nardo 2015; Curto *et al.* 2014). This class of transcription factors has the property to act both cell-autonomously and non-cell autonomously after secretion and internalization in target cells. The Otx2 homeoprotein is expressed by choroid plexus (CP), secreted in CSF, and transfers in brain parenchyma to regulate visual cortex plasticity in postnatal mice (Spatazza *et al.* 2013). Otx2 is a regulator of embryonic development and embryonic neurogenesis but its role on adult neurogenesis has not been investigated. We show that Otx2 transfers in supporting cells of aSVZ-RMS neurogenic niche and regulates production of new neurons in OB. We find that Otx2 impacts neurogenesis possibly by modifying the expression of astrocyte-derived extracellular matrix (ECM).

## Results

### *Otx2 knockdown in choroid plexus leads to reduced integration of newborn neurons in the olfactory bulb*

In the adult mouse, continuous production of aSVZ progenitors and integration of new neurons in the OB are regulated in part by factors coming from the CSF (Bjornsson *et al.* 2015). Given that *Otx2* is expressed and secreted by CP, we first examined whether *Otx2* knockdown in CP alters aSVZ neurogenesis. We have previously shown that Cre-Tat intracerebroventricular injections in lateral ventricles of *Otx2<sup>lox/lox</sup>* (*Otx2-lox*) mice lead to specific recombination of *Otx2* gene in CP (Spatazza *et al.* 2013). We now extend this result by not only confirming this paradigm leads to strong decrease of *Otx2* expression in lateral ventricle CP ( $41.1\% \pm 14.3$  SD of *Otx2* expression compared to vehicle-injected mice, Figure 1A-B), but also a directly proportional decrease of *Otx2* mRNA in both lateral and 4<sup>th</sup> ventricle CP (Figure 1C,  $p=0.0007$ ). This allows for the use of 4<sup>th</sup> ventricle CP to assess *Otx2* expression levels while anterior tissues are used for histology. Cre-Tat-injected animals with less than 30% *Otx2* expression knockdown were removed from analysis.

Several BrdU injection paradigms were used to evaluate aSVZ neurogenesis. A first paradigm quantified BrdU+ cells in OB three weeks after BrdU injections to evaluate newborn neuron integration in OB (Figure 1D). A second paradigm quantified BrdU+ cells in aSVZ 2 hours after BrdU injection to evaluate progenitor cell proliferation (Figure 1H). In the first paradigm, significantly fewer BrdU+ cells were counted in granule cell layer (GCL) of Cre-Tat-injected mice compare to vehicle-injected mice ( $75.6\% \pm 21.3$  SD of vehicle, Figure 1E, F) while there was no change in glomerular layer (GL) ( $92.2\% \pm 22.8$  SD of vehicle, Figure 1E, G). In the second paradigm, Cre-Tat-injected mice showed similar cell proliferation in aSVZ ( $98.6\% \pm 13.7$  SD of vehicle, Figure 1I, J). Therefore, *Otx2* expression in CP regulates aSVZ neurogenesis, although the reduced number of newborn neuron integration in GCL is not a consequence of reduced aSVZ proliferation.

### *Non-cell autonomous Otx2 in aSVZ and RMS*

Given that *Otx2* expression in CP impacts aSVZ neurogenesis and is able to transfer in brain parenchyma (Spatazza *et al.* 2013) we hypothesized that *Otx2* transfers from CP to the aSVZ niche. The *Otx2* locus is silent in aSVZ and RMS, as

shown by the absence of GFP expression in *Otx2<sup>+ /GFP</sup>* mice (Acampora *et al.* 2009) (Figure A-B) and by *in situ* hybridization (Figure 2C). However, we were able to immunoprecipitate Otx2 protein from lysates of aSVZ and RMS microdissections (Figure 2D), as confirmed by lysates of superior colliculus as positive control and of striatum (microdissected beneath aSVZ) as negative control (Figure 2E). Immunostaining showed selective internalization of Otx2 in a subset of cells within the aSVZ, RMS and OB (Figure 2F-H).

Given the presence of Otx2 protein in these neurogenic niches, the correlation between neurogenesis and choroid plexus *Otx2* expression could be due to Otx2 non-cell autonomous activity. To address this possibility specifically, we used a single chain antibody (scFv) mouse model (scFv-Otx2 mice) that sequesters Otx2 in the CSF and blocks its transfer (Bernard *et al.* 2016). Intracerebroventricular injections of Cre-Tat lead to local scFv-Otx2 expression by CP cells (GFP reporter, Figure 3A) and secretion into the CSF (Bernard *et al.* 2016). Subjecting these mice to the BrdU paradigm for OB integration (Figure 1D) revealed a decrease in newborn neurons in the GCL of Cre-Tat-injected animals ( $71.7\% \pm 17.8$  SD of vehicle, Figure 3B) and no significant change in the GL ( $82.9\% \pm 14.7$  SD of vehicle, Figure 3C). This decrease is similar to what was observed in the CP *Otx2* knockdown model (Figure 1F-G), and suggests that Otx2 transfer from CSF to aSVZ plays a significant role in regulating adult neurogenesis.

#### *Otx2 transfers in aSVZ and RMS supporting cells and regulates ECM*

Given that Otx2 is transferring to a subset of aSVZ and RMS cells, it could be targeting either stem or progenitor cells directly and/or other cells within the niche. Immunostaining revealed that Otx2 is not internalized in neuroblasts in aSVZ (Figure 4A) and RMS (Figure 4C). Indeed, we find Otx2 in GFAP-labeled cells and ependymal cells of aSVZ (Figure 4A, B). In RMS, Otx2 was also found in GFAP labeled (Figure 4C, D). The accumulation of Otx2 protein in supporting cells within the niche suggests that Otx2 regulates aSVZ neurogenesis through modification of the niche microenvironment. In aSVZ and RMS, Thrombospondin-4 (*Thbs4*) and Tenascin-C (*Tnc*) are ECM proteins expressed by astrocytes. We found that both *Thbs4* and *Tnc* were upregulated in aSVZ of Cre-Tat injected *Otx2-lox* mice ( $304.6\% \pm 114.5$  SD and  $201.1\% \pm 94$  SD of vehicle respectively, Figure 5). Their expression did not change in



OB and striatum (data not shown). Thus, Otx2 transfer to niche astrocytes might regulate neurogenesis by controlling ECM composition.

## Discussion

Through specific conditional recombination in the choroid plexus of two mouse models, similar decreases in neurogenesis were observed. With the Otx2-lox mice, recombination results in loss of local Otx2 expression in the choroid plexus, while with the scFv-Otx2 mice it results in sequestering of Otx2 in the CSF. The first model includes both potential cell-autonomous effects of loss of Otx2 in the choroid plexus as well potential non-cell autonomous effects through reduced levels of secreted Otx2. The second model comprises only non-cell autonomous effects as only secreted Otx2 is affected. This is confirmed by the absence of autocrine effects (i.e. CSF Otx2 signaling on choroid plexus) assessed by choroid plexus mRNA levels of Otx2 transcription targets upon scFv expression. Since both models provide a similar reduction in the number of newborn neurons, it suggests that Otx2 non-cell autonomous function is of primary importance for adult neurogenesis.

The specific internalization of Otx2 in aSVZ and RMS astrocytes might be a consequence of specialized ECM around these cells. In the visual cortex, Otx2 is specifically internalized by parvalbumin interneurons, which have a unique and stable ECM called perineuronal nets (PNN) that often stain for the lectin *Wisteria floribunda* (WFA) (Sugiyama *et al.* 2008). Interestingly, Otx2 also influences perineuronal net formation in the visual cortex and has been shown to control expression of extracellular glycoproteins and glycosaminoglycans *in vitro* (Nguyen-Ba-Charvet *et al.* 1998; Bernard & Prochiantz 2016). This is in keeping with the changes in aSVZ expression of *Tnc* and *Thbs4* we observed. Staining for WFA is not detected in the aSVZ, which is not surprising given that PNN are synonymous with consolidation of ECM and a break on plasticity, events that would counter the function of the neurogenic niche. The target glycosaminoglycans of Otx2 have yet to be identified, as an antibody or lectin that label ECM molecules has yet to be found having 100% co-localization with Otx2. Nonetheless, the hypothesis of ECM-Otx2 interaction accounting for the specific internalization remains the most plausible, given that homeoprotein cell-surface receptors have not been found (Bernard & Prochiantz 2016).

Neurogenesis is impacted by the composition of ECM in stem cells niches (Dityatev *et al.* 2010). ECM glycoproteins and proteoglycans can trap molecules that signal through receptors or internalization. Astrocytes in the aSVZ and RMS secrete

many ECM molecules including *Tnc* and *Thbs4* (Kazanis *et al.* 2007; Jankovski & Sotelo 1996; Benner *et al.* 2013). *Thbs4* is expressed only by astrocytes specifically in the aSVZ and RMS, while *Tnc* is also expressed in other regions of the brain (Girard *et al.* 2014; Wiese *et al.* 2012). *Thbs4* knockout mice have reduction of newly generated interneurons in the OB probably due to disruption of neuroblasts chains in the RMS (Girard *et al.* 2014). Concerning *Tnc*, knockout mice have no signs of neurogenesis disruption (Kazanis *et al.* 2007).

*Thbs4* knockout adult mice show reduced newly born neurons in the OB yet no defect of embryonic neurogenesis (Girard *et al.* 2014). Thus, *Thbs4* is an important regulator of adult neurogenesis, possibly by facilitating neuroblast migration toward the OB. However, we find an increase of *Thbs4* expression in mice showing decreased neurogenesis, contrary to what might be expected given the results with *Thbs4* knockout mice. Furthermore, while *Tnc* knockout mice show no signs of altered adult neurogenesis (Kazanis *et al.* 2007), we observe increase *Tnc* expression in mice showing decreased neurogenesis. It is indeed possible that the expression of several ECM molecules has been altered by the loss of *Otx2*, suggesting that ECM composition must be tightly controlled to maintain proper neurogenesis. While an ~20 % decrease in OB newborn neurons occurred after *Otx2* knockdown, no change in aSVZ proliferation was observed. Taken together, non-cell autonomous *Otx2* might regulate neurogenesis through control of neuroblast migration.

## Materials & Methods

### *Mice and ethics statement*

S129 mice were purchased from Charles River Laboratories. Otx2-lox mice were kindly donated by Dr. T. Lamonerie (Fossat *et al.* 2006). scFv-Otx2 knock-in mouse lines were previously described (Bernard *et al.* 2016). All animal procedures, including housing, were carried out in accordance with the recommendations of the European Economic Community (86/609/EEC), the French National Committee (87/848) and French bylaws (AGRG1240332A / AGRG1238724A / AGRG1238767A / AGRG1238729A / AGRG1238753A). For surgical procedures, animals were anesthetized with Xylazine (Rompun 2%, 5mg/kg) and Ketamine (Imalgene 500, 80mg/kg). For biochemical analysis, mice were sacrificed by cervical elongation. This research (project no. 00704.02) was approved by Ethics committee n° 59 of the French Ministry for Research and Higher Education. Mice were conventionally raised (12:12hr light:dark cycle) in cages with red tunnels, nesting cotton, and with food and water ad libitum.

### *Mouse surgery*

Cre-Tat recombinant protein was produced as described (Spatazza *et al.* 2013). Cre-Tat (8 to 20µg/ml in 400mM NaCl, 15% DMSO) or vehicle was injected as previously described (Spatazza *et al.* 2013). 10 days after Cre-Tat injection, mice were injected intraperitoneally with 150mg/kg of BrdU (Sigma B9285 at 10mg/ml diluted in NaCl 0.9%). For integration experiments, mice were injected twice daily for five days, and then housed for 3 weeks prior to perfusion with PBS. For proliferation experiments, mice were perfused with PBS two hours after one pulse of BrdU. Brains were cut in half: the anterior half was fixed for 48h at 4°C in 4% formaldehyde PBS, immersed overnight in 20% sucrose PBS, and processed for cryostat sectioning; the posterior half was used to recover 4<sup>th</sup> ventricle choroid plexus for quantitative PCR analysis of Otx2 expression.

### *Immunohistochemistry and histology*

Frozen brains were sectioned (25 µm) by cryostat and stored at -20 °C. Slides were thawed 15 min at room temperature, hydrated in PBS, and incubated in a steamer for 15 min with 10 mM citrate buffer, pH 6. After cooling, sections were washed with PBS

and incubated in blocking buffer (0.5% Triton-X, 10% normal donkey serum (Abcam) in PBS) for 30 min. Primary antibodies were incubated overnight at room temperature (anti-BrdU OBToo30 ABD Serotech 1/100; anti-Otx2 ab92326 Abcam 1/250; anti-DCX AB2253 Millipore 1/1000; anti-GFAP G6171 Sigma 1/200; anti-Vimentin AB5733 Millipore 1/1000; anti-GFP ab13970 Abcam 1/1000). After PBS washes, secondary antibodies were incubated 2 hours at room temperature (Donkey anti-IgG Alexa fluor antibody Invitrogen 1/2000 or anti-guinea pig biotinylated ab6907 Abcam 1/500). Sections treated with biotinylated secondary antibodies were further incubated 2 hours with dye-conjugated streptavidin (Invitrogen). Sections were dried and mounted in Dapi Fluoromount-G. Imaging was performed with an inverted confocal microscope (Leica), a Nikon 90i upright widefield, or a Spinning-disk with constant parameters. For BrdU analysis, one section every 200  $\mu\text{m}$  was quantified. Counting was performed using ImageJ software with systematic methods (background correction and thresholding). In situ hybridization was performed as previously described (Spatazza *et al.* 2013).

#### *Quantitative PCR*

Total RNA from 4<sup>th</sup> ventricle choroid plexus were extracted with the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) with DNA removal. RNA and protein were extracted for ECM composition analysis using the AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen). RNA was processed with the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen). cDNA was diluted 1/10 with RNase-free water for quantitative PCR, samples, which were analyzed in triplicate with a LightCycler 480 II (Roche) and SYBR Green I Master mix. After  $T_m$  profile validation, gene-to-HPRT ratios were determined by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. For *Otx2* expression analysis, mean expression of vehicle-injected mice was used for comparison.

#### *RMS microdissection*

Brain was placed in cold PBS, dorsal side facing up, and two equidistant longitudinal incisions in each OB were made to divide them in 3 parts while keeping them attached to the rest of the brain. The aSVZ was then microdissected as previously described (Mirzadeh *et al.* 2010). Afterwards, the hemispheres were placed once again dorsal side facing up and the sagittal cuts starting from the OB incisions were

pursued the entire length of the brain. The central piece of tissue was laid on its side and RMS was cut out, as shown in Figure 2D.

#### *Immunoprecipitation and Western blot*

Tissue was microdissected and stored at -80 °C. Tissues were triturated in 100 µl of lysis buffer (150 mM NaCl, 1% Triton, 100 mM Tris, pH 7.4, 10 mM EDTA, 1X protease/phosphatase inhibitor (Roche)) per 10 mg of tissue and incubated 10 min on ice. Supernatant was recovered in low binding tubes after centrifugation for 10 min at 16 000g. Antibody was added (2.5µg of anti-Otx2 (ab21990, Abcam) or anti-IgG (ab27478, Abcam) and incubated overnight at 4°C with rotation. Protein A sepharose beads (GE Healthcare) were washed twice and resuspended 1:1 with lysis buffer. Beads (30 µl) were added to each sample and incubated 3 h at 4 °C. Beads were recovered by centrifugation for 1 min at 16 000g and washed 5 times with 1 mL of cold wash buffer (Lysis buffer with 500 mM NaCl). Proteins were eluted from the beads with 30 µl of 2X laemmli buffer, heated 5 min at 95 °C, and stored at -20 °C.

Samples were separated on NuPage 4-12% Bis-Tris precasted gels (Invitrogen) with 1X MES buffer and antioxidant (Invitrogen), then processed for Western Blotting for Otx2 detection. Membranes were blocked in 5% non-fat milk, TBS, 0.2% Tween, incubated with anti-Otx2 (in-house mouse monoclonal) overnight at 4 °C, washed, and then incubated with anti-mouse HRP-conjugated (GeneTex) for 2 h at room temperature. Chemiluminescence reaction was performed with ECL femto (Thermo Scientific).

#### *Statistical analysis*

Prism 6 software (GraphPad) was used for all statistical analysis. Sample size was determined after preliminary experiments. Quantification was normalized by the mean value of vehicle-injected mice samples. Normal data distribution was assessed by the D'Agostino & Pearson omnibus normality test. See Figure Legends for relevant statistical tests.

#### **Acknowledgements**

We thank A. Simeone for *Otx2*<sup>+/GFP</sup> mice.

This work was supported by Region Ile-de-France via le DIM Cerveau et pensée

Figures

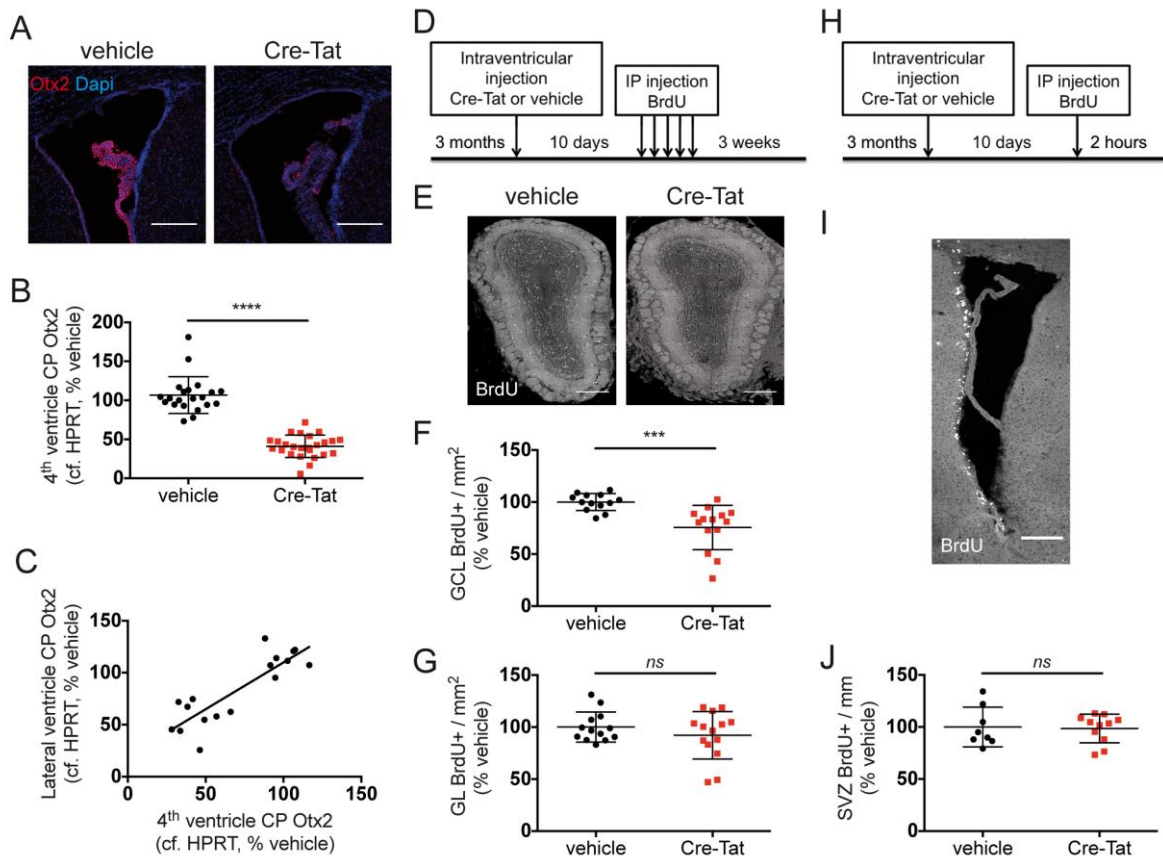
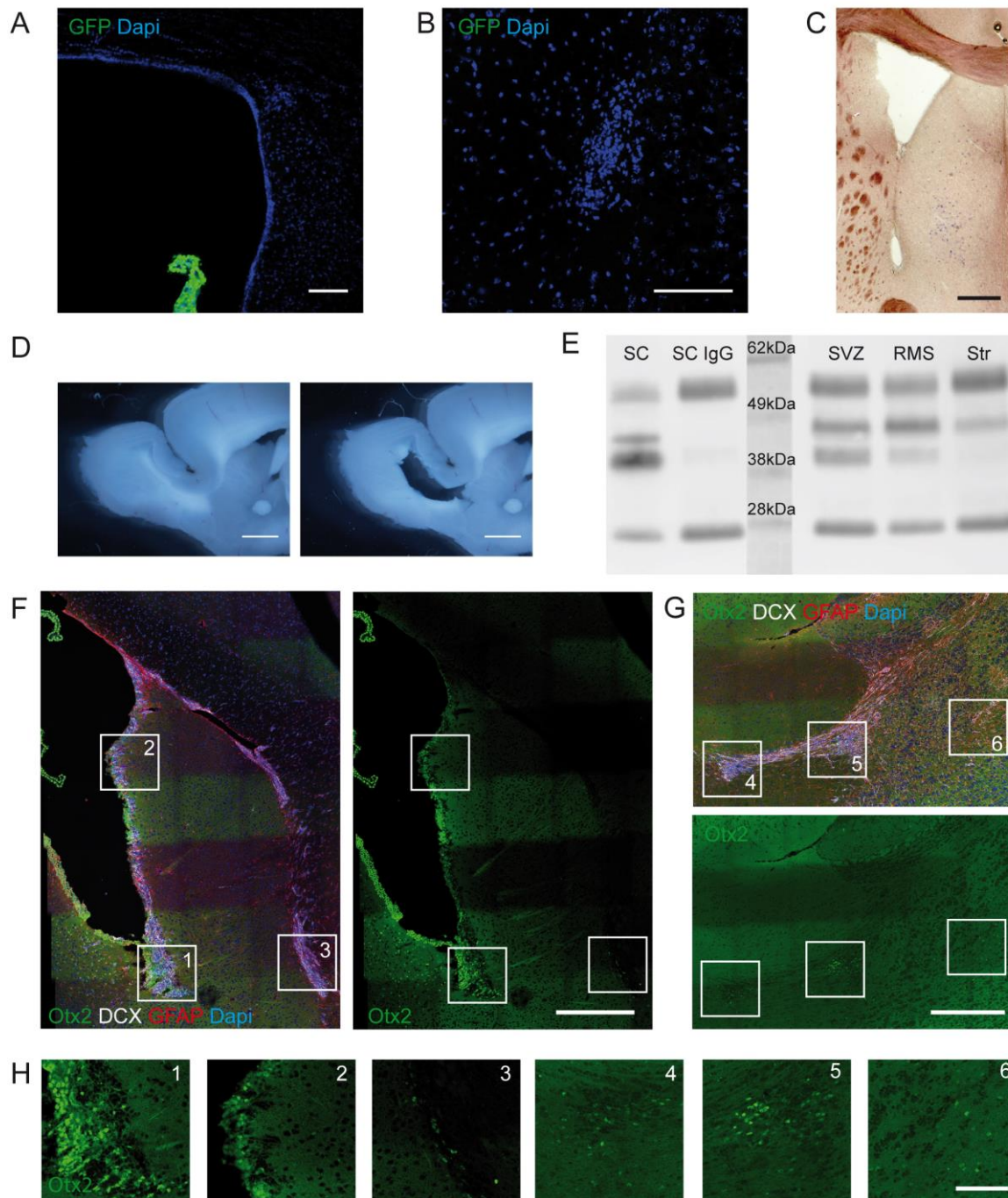


Figure 1. *Otx2* knockdown in the choroid plexus reduces newborn neurons in the olfactory bulb.

(A-C) Conditional *Otx2* knockdown paradigm with *Otx2-lox* mice. (A) Staining for *Otx2* in lateral ventricle choroid plexus 35 d after intracerebroventricular (icv) injection of vehicle or Cre-Tat (scale bar, 200  $\mu$ m). (B) Quantitative PCR analysis of *Otx2* expression in 4<sup>th</sup> ventricle (Mann-Whitney test, 5 experiments, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). (C) Comparison of *Otx2* expression levels between lateral and 4<sup>th</sup> ventricles from the same brain after Cre-Tat icv injection.

(D-G) Analysis of OB newborn neurons in *Otx2-lox* mice. (D) Schematic of adult (3 months) neurogenesis paradigm. (E) Staining for BrdU in olfactory bulbs 3 weeks post-injection (scale bar, 400  $\mu$ m). (F) Quantification of BrdU-positive cells in granule cell layer (GCL) (t-test, 3 experiments, \*\*\*  $p < 0.001$ , ns  $p > 0.05$ ). (G) Quantification of BrdU-positive cells in glomerular layer (GL) (t-test, n=?, 3 experiments, ns  $p > 0.05$ ).

(H-J) Analysis of aSVZ proliferation in *Otx2-lox* mice. (H) Schematic of adult (3 months) aSVZ proliferation paradigm. (I) Staining for BrdU in aSVZ 2 hours post-injection (scale bar, 200  $\mu$ m). (J) Quantification of BrdU-positive cells in aSVZ (t-test, 2 experiments, ns  $p > 0.05$ ). Error bars, SD



**Figure 2.** *Otx2* in RMS and aSVZ is non-cell-autonomous.

(A-C) Absence of *Otx2* expression in aSVZ (A, C) and RMS (B) as shown by GFP staining in *Otx2*<sup>+/GFP</sup> mice (A, B) and *in situ* hybridization (C). Note the expression of GFP in choroid plexus (A) (Scale bars, 100  $\mu$ m in A and B, 250  $\mu$ m in C).

(D) RMS microdissection on sagittal section (scale bar, 1 mm).

(E) Western blot analysis of *Otx2* immunoprecipitation from lysate of various brain regions. Bands include *Otx2* (<40 kDa), IgG (25 and 55 kDa), and unknown (~45 kDa). SC, superior colliculus; Str, striatum.

(F-H) Staining for *Otx2*, Dcx, GFAP and Dapi in sagittal sections showing the aSVZ (F, H1, H2), RMS (F, G, H3-5) and OB (G, H6). Magnification of boxes 1-6 are shown in H (Scale bars, 300  $\mu$ m in F and G, 100  $\mu$ m in H).



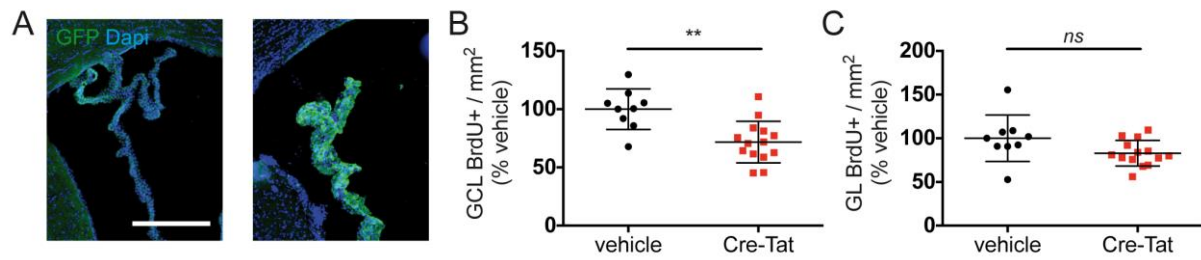


Figure 3. Non-cell-autonomous *Otx2* is sufficient to regulate adult neurogenesis.

(A) Efficient recombination in choroid plexus of scFv-Otx2 mice after icv injection of Cre-Tat assessed by GFP reporter (scale bar, 200 μm).

(B-C) Analysis of adult neurogenesis (paradigm in Figure 1D) in scFv-Otx2 mice. (B) Quantification of BrdU-positive cells in granule cell layer (GCL). (C) Quantification of BrdU-positive cells in glomerular layer (GL) (t-test, 3 experiments, \*\*  $p < 0.01$ , *ns*  $p > 0.05$ , error bars, SD)

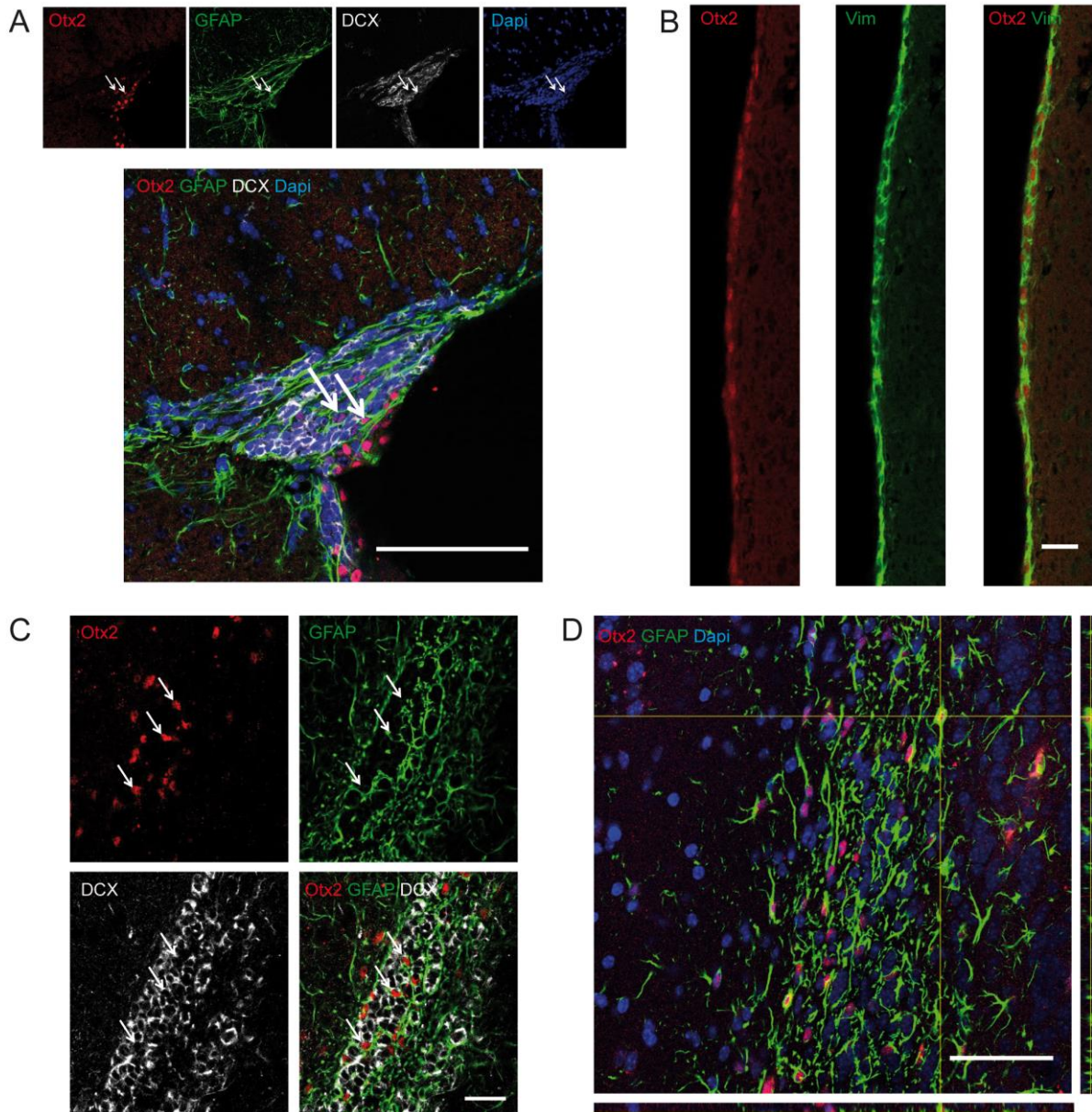


Figure 4. *Otx2* transfers into supporting cells of neurogenic niches.

(A) In dorsal aSVZ, *Otx2* staining is detected in GFAP-labeled astrocytes but not in Dcx-labeled neuroblasts (scale bar, 100  $\mu$ m). Arrows highlight astrocytes containing *Otx2*.

(B) Along the lateral ventricular wall, *Otx2* staining is detected in vimentin (Vim) labeled ependymal cells (scale bar, 30  $\mu$ m).

(C-D) In the RMS, *Otx2* staining is detected in GFAP-labeled astrocytes but not in Dcx-labeled neuroblasts (scale bar, 30  $\mu$ m). Arrows highlight astrocytes containing *Otx2*. (D) Orthogonal projection shows *Otx2* in the nucleus of astrocytes.

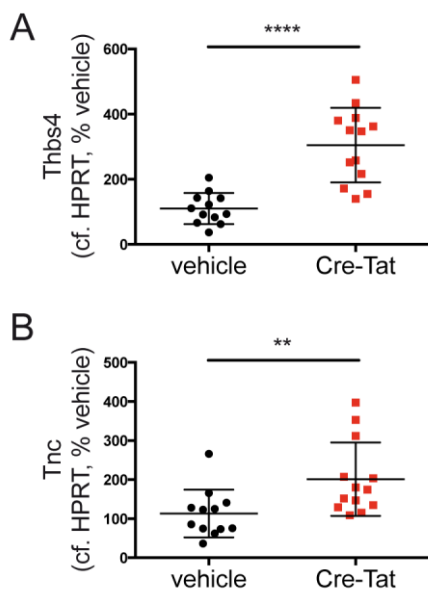


Figure 5. Expression of ECM proteins is perturbed after conditional knockdown of *Otx2* in choroid plexus.

(A-B) Quantitative PCR analysis of *Thbs4* (A) and *Tnc* (B) expression in aSVZ of *Otx2*-lox mice after icv injection of Cre-Tat or vehicle (t-test, 3 experiments, \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , error bars, SD).

## References

- Acampora, D. *et al.*, 2009. Selective inactivation of Otx2 mRNA isoforms reveals isoform-specific requirement for visceral endoderm anteriorization and head morphogenesis and highlights cell diversity in the visceral endoderm. *Mechanisms of development*, 126(10), pp.882–897.
- Benner, E.J. *et al.*, 2013. Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature*, 497(7449), pp.369–373.
- Bernard, C. & Prochiantz, A., 2016. Otx2-PNN Interaction to Regulate Cortical Plasticity. *Neural plasticity*, 2016, p.7931693.
- Bernard, C. *et al.*, 2016. A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor. *PLoS genetics*, 12(5), p.e1006035.
- Bjornsson, C.S. *et al.*, 2015. It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Developmental Cell*, 32(4), pp.435–446.
- Curto, G.G. *et al.*, 2014. Pax6 is essential for the maintenance and multi-lineage differentiation of neural stem cells, and for neuronal incorporation into the adult olfactory bulb. *Stem cells and development*, p.140812130339002.
- Dityatev, A., Seidenbecher, C.I. & Schachner, M., 2010. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends in Neurosciences*, 33(11), pp.503–512.
- Girard, F., Eichenberger, S. & Celio, M.R., 2014. Thrombospondin 4 deficiency in mouse impairs neuronal migration in the early postnatal and adult brain. *Molecular and cellular neurosciences*, 61, pp.176–186.
- Jankovski, A. & Sotelo, C., 1996. Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *The Journal of Comparative Neurology*, 371(3), pp.376–396.
- Kaneko, N. *et al.*, 2010. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron*, 67(2), pp.213–223.
- Kazanis, I. *et al.*, 2007. The adult mouse subependymal zone regenerates efficiently in the absence of tenascin-C. *The Journal of neuroscience*, 27(51), pp.13991–13996.
- lehtinen, M.K. *et al.*, 2013. The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. *The Journal of neuroscience*, 33(45), pp.17553–17559.
- Lledo, P.-M. & Valley, M., 2016. Adult Olfactory Bulb Neurogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.

- Lois, C., García-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A., 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5251), pp.978–981.
- Mirzadeh, Z. *et al.*, 2010. The subventricular zone en-face: wholemount staining and ependymal flow. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (39).
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T. *et al.*, 1998. A potential role for the OTX2 homeoprotein in creating early “highways” for axon extension in the rostral brain. *Development*, 125(21), pp.4273–4282.
- Prochiantz, A. & Di Nardo, A.A., 2015. Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. *Neuron*, 85(5), pp.911–925.
- Sawamoto, K. *et al.*, 2006. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science (New York, N.Y.)*, 311(5761), pp.629–632.
- Spatazza, J. *et al.*, 2013. Choroid-plexus-derived otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell reports*, 3(6), pp.1815–1823.
- Sugiyama, S. *et al.*, 2008. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell*, 134(3), pp.508–520.
- Whitman, M.C. *et al.*, 2009. Blood Vessels Form a Migratory Scaffold in the Rostral Migratory Stream. *The Journal of Comparative Neurology*, 516(2), pp.94–104.
- Wiese, S., Karus, M. & Faissner, A., 2012. Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Frontiers in pharmacology*, 3, p.120.

### V- 3. Conclusion

Dans cette seconde étude, nous avons montré que l'expression d'*Otx2* dans les PC régule la formation des nouveaux neurones chez l'adulte. Les paradigmes expérimentaux ont permis d'observer une diminution de la formation de nouveaux neurones dans le BO, mais pas de changement de prolifération dans la ZSV après le knockdown d'*Otx2* dans les PC adultes. Cette diminution de la neurogenèse adulte s'accompagne d'un changement d'expression de protéines de la MEC. En effet, les RT qPCR ont montré une surexpression de *Tnc* et de *Thbs4* dans les PC des animaux knockdown pour *Otx2*. Ces molécules sont exprimées par les astrocytes dans la ZSV et le CMR, et une diminution de *Thbs4* entraîne une baisse de la neurogenèse adulte, probablement causée par une migration anormale des neuroblastes (Girard *et al.* 2014). Ceci suggère une régulation de la neurogenèse adulte par les astrocytes grâce à la MEC, et notre étude met en évidence l'internalisation d'*Otx2* dans les astrocytes de la ZSV et du CMR. Nous avons montré dans un premier temps qu'*Otx2* n'est exprimé ni dans la ZSV ni dans le CMR grâce à la souris rapportrice *Otx2<sup>+</sup>/GFP* et des hybridations *in situ*. Le transfert d'*Otx2* a été montré par immunoprécipitation et western blot, et caractérisé par immunomarquage. Nous avons constaté l'internalisation d'*Otx2* dans deux types de cellules de support, les astrocytes de la ZSV et du CMR et les cellules épendymaires de la ZSV, mais pas dans les neuroblastes. Les observations du mur ventriculaire suggèrent qu'*Otx2* n'est pas internalisée dans les progéniteurs de type C. L'internalisation d'*Otx2* dans les astrocytes et le changement d'expression de *Tnc* et *Thbs4* suggèrent un rôle non-cellulaire-autonome d'*Otx2*. Nous avons testé cette hypothèse en utilisant le modèle murin scFv-*Otx2* qui permet la capture d'*Otx2* dans le LCS et empêche sa distribution dans le parenchyme cérébral. Nous observons une diminution de la formation de nouveaux neurones dans le BO des souris exprimant cet anticorps, montrant que le transfert d'*Otx2* régule la neurogenèse adulte.



## **VI- Discussion**





L'étude du rôle d'une seule molécule ne doit pas faire oublier que la niche de la ZSV est un environnement extrêmement complexe, avec de nombreuses interactions, des boucles d'autorégulation et des mécanismes redondants. Ainsi, la compréhension du rôle d'une protéine dans ce processus requiert de comprendre le type cellulaire impacté, l'interaction entre ce type cellulaire et les autres cellules de son environnement, les voies métaboliques régulées par cette protéine, et enfin l'interaction de ces voies métaboliques avec d'autres, déjà caractérisées.

## **VI- 1. Analyse des plexus choroïdes adultes et de la fonction cellulaire-autonome d'Otx2**

### ***VI- 1.a Les plexus choroïdes sont hétérogènes et remplissent des fonctions différentes***

Après le développement des PC, l'expression d'Otx2 est requise afin de maintenir le PC du 4<sup>e</sup> ventricule, mais pas les PC des ventricules latéraux, montrant une disparité entre les PC de différentes origines (Johansson *et al.* 2013). Cette observation est confirmée par une analyse transcriptionnelle sur des PC des ventricules latéraux et du 4<sup>e</sup> ventricule issus d'embryons de souris (Lun, Johnson, *et al.* 2015). Dans cette étude, les auteurs ont également montré l'expression différentielle de quatre gènes entre les PC adultes des différentes origines.

Notre étude fournit un transcriptome complet des PC adultes des ventricules latéraux et du 4<sup>e</sup> ventricule réalisé par une approche de séquençage des ARN, qui sont plus fiables que les puces à ARN. Nos données retrouvent l'hétérogénéité spatiale des PC observée en embryonnaire par Lun *et al.* (2015). Nous avons également montré que le rôle spécifique d'Otx2 à chaque PC est conservé chez l'adulte, car on observe une dérégulation de gènes différente pour chacun d'eux. De plus, davantage de gènes sont différentiellement exprimés dans le PC du 4<sup>e</sup> ventricule après injection de Cre-Tat, suggérant un rôle plus important d'Otx2 dans la régulation génique de ce PC.

Etant donné que les PC ont des expressions hétérogènes et potentiellement des rôles différents, l'étude spécifique d'un seul type de PC devra être développée. La génération de souris permettant l'expression ou l'extinction d'un gène de manière inductible, dans un seul type de PC, sera un précieux outil pour adresser plus spécifiquement la fonction d'un gène. Dans le contexte de notre étude sur Otx2, l'injection de Cre-Tat dans les ventricules latéraux entraîne une recombinaison également dans le PC du 4<sup>e</sup> ventricule. Des croisements de lignée de souris exprimant la Cre dans un seul PC, avec les souris *Otx2<sup>lox/lox</sup>* (Otx2-lox), permettront de faire un knockdown d'Otx2 dans un seul type de PC. Par exemple, une lignée *Drmta3-Cre<sup>ERT2</sup>* permettrait d'induire la recombinaison, chez l'adulte, du gène *Otx2* dans les PC des ventricules latéraux uniquement. On pourra alors étudier si l'expression d'Otx2 dans

les PC des ventricules latéraux, qui longe la ZSV, est suffisante pour réguler la neurogenèse adulte.

### **VI- 1.b L'expression d'Otx2 dans les plexus choroïdes régule leur homéostasie**

Durant le développement embryonnaire, Otx2 est nécessaire à la mise en place des PC (Johansson *et al.* 2013) mais son rôle dans les PC adultes n'a pas été investigué auparavant. Le développement (Annexe A) et de nombreuses fonctions des PC ont été caractérisés (Lun, Monuki, *et al.* 2015). Ils forment notamment une barrière entre le système nerveux central et la périphérie qui peut être affectée en cas de pathologie (Kaur *et al.* 2016). Le vieillissement est associé avec le développement d'anomalies morphologiques et une diminution de leur capacité de sécrétion (Damkier *et al.* 2013).

Notre étude montre que de nombreux facteurs sont différentiellement exprimés après knockdown d'Otx2 chez des souris adultes. Ainsi, Otx2 est un régulateur important de l'expression génique dans les PC adultes. De nombreux facteurs impliqués dans l'immunité sont surexprimés dans les PC des souris Otx2-lox injectées Cre-Tat, ce qui pourrait indiquer une inflammation des PC. L'augmentation de ces molécules peut également traduire ou provoquer une invasion des PC par des cellules immunitaires. L'expression de Klotho est diminuée dans les PC des souris Otx2-lox, ce qui suggère une accélération du vieillissement (Kuro-o *et al.* 1997). Ainsi, la diminution d'Otx2 semble délétère pour les PC.

Pour discriminer entre un rôle d'Otx2 dans l'intégrité des PC et un problème dû à l'injection de Cre-Tat, des injections de cette protéine dans le ventricule de souris WT pourront révéler un effet inflammatoire de la protéine. Otx2 est important pour le maintien des PC du 4<sup>e</sup> ventricule en embryonnaire. Afin de savoir si Otx2 est nécessaire au maintien des PC chez l'adulte, il faudrait réaliser des études morphologiques afin d'attester d'une modification des PC après knockdown. Une analyse de l'expression d'Otx2 durant le vieillissement, qui est associé à des atteintes morphologiques des PC, indiquera si Otx2 est important pour le maintien des PC. Nous réalisons également des marquages par essai TUNEL, afin d'évaluer la mort cellulaire, et du marqueur de prolifération Ki67 sur les PC des ventricules latéraux des souris Otx2-lox. Si Ki67 est exprimée, alors qu'il n'y a plus de prolifération chez l'adulte, ceci indiquerait que les PC présentent des anomalies dues au knockdown

d'*Otx2*. L'impact du knockdown d'*Otx2* sur les différentes fonctions des PC, à savoir la surveillance immunologique, la détoxification et la signalisation, pourra être adressé spécifiquement. Par exemple, pour attester d'un rôle d'*Otx2* dans la régulation de l'immunité dans les PC, des marquages de cellules immunitaires ou d'indicateur d'inflammation pourront être réalisés.

## VI- 2. Etude des cibles moléculaires et partenaires d'Otx2

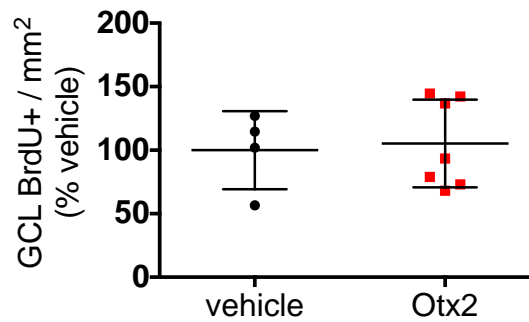
### ***VI- 2.a Régulation de l'expression des protéines de la matrice extracellulaire par Otx2***

Les molécules de la MEC Tnc et DSD1-PG sont des cibles transcriptionnelles d'Otx2. Tandis qu'Otx2 réprime l'expression de la Tnc, elle active celle de DSD1-PG (Boncinelli & Morgan 2001). La régulation de Thbs4 par Otx2 n'a jamais été abordée.

Notre étude montre une augmentation de Tnc dans la ZSV des souris knockdown pour Otx2. En considérant que la diminution d'Otx2 dans la ZSV est la cause de l'augmentation de l'expression de la Tnc, nos données sont en accord avec la littérature et Thbs4 pourrait être une nouvelle cible transcriptionnelle d'Otx2. Il semble toutefois que la régulation de Thbs4 ne réponde pas au même mécanisme que l'expression de Tnc. En effet, l'augmentation des ARN de Thbs4 (4 fois) est bien supérieure à celle des ARN de Tnc (2 fois). Ceci pourrait être une conséquence de réseaux de transcription différents pour ces gènes.

Nous pourrions adresser la question de l'expression de DSD1-PG dans nos modèles de knockdown d'Otx2. Une diminution d'expression traduirait leur expression par les astrocytes ou les cellules épendymaires, et donc la participation de ces cellules à la formation des fractones. Afin de consolider notre hypothèse de la régulation de l'expression de ces molécules par Otx2, nous avons testé un modèle de gain de fonction d'Otx2. Après infusion de protéine recombinante Otx2 dans les ventricules, nous n'avons pas observé de changement du nombre de nouveaux neurones dans le BO (Figure 36). Toutefois, l'infusion dans le LCS pourrait être un facteur de dilution trop important pour avoir un changement suffisant d'internalisation par les astrocytes et les cellules épendymaires pour modifier la neurogenèse. La protéine pour aussi être peu stable, et se dégrader durant le temps l'infusion. Nous ne pouvons donc pas utiliser ce modèle de gain de fonction d'Otx2 pour confirmer le rôle répresseur d'Otx2 sur l'expression de la Tnc et de Thbs4.

Nos données de séquençage ARN dans les PC montrent une faible expression de ces molécules et les PC ne constituent pas un modèle pour adresser la question de leur régulation par Otx2 (Tableau 4).



**Figure 36 : L'infusion d'Otx2 ne modifie pas la neurogenèse**

En utilisant le protocole d'intégration (Partie V- 2, Figure 1D, p.166), nous n'observons pas de changement du nombre de nouveaux neurones générés dans le BO des animaux infusés avec de l'Otx2 recombinante dans les ventricules (105,3% des animaux infusés avec la solution véhicule).

**Tableau 4 : Expression de *Thbs4* et *Tnc* dans les PC adulte**

Gene	Analysis	Vehicle / WT reads	Cre-Tat / heterozygote reads
<i>Thbs4</i>	Otx2-lox <i>Lat. V CP</i>	7,90	4,55
	Otx2-lox <i>4th V CP</i>	0,56	0,00
	<i>Otx2</i> <sup>+/<i>GFP</i></sup> <i>4th V CP</i>	4,00	0,50
<i>Tnc</i>	Otx2-lox <i>Lat. V CP</i>	79,68	99,47
	Otx2-lox <i>4th V CP</i>	5,76	5,12
	<i>Otx2</i> <sup>+/<i>GFP</i></sup> <i>4th V CP</i>	12,67	6,45

## **VI- 2.b Potentielle implication d'Otx2 dans la régulation de l'épissage**

Otx2 est un facteur de transcription et pourrait également être impliquée dans la régulation de la traduction (Fant *et al.* 2015).

La spectrométrie de masse après co-immunoprécipitation d'Otx2 dans les PC, la ZSV, le CMR et le cortex visuel a montré l'association d'Otx2 à la machinerie d'épissage des ARN. De plus, un résultat très préliminaire de co-immunoprécipitation d'Otx2 avec les ARN dans les PC a permis d'identifier 21 petits ARN nucléaires (snRNA) impliqués dans l'épissage. Toutefois, cette expérience n'avait pas de contrôle et j'ai récemment réalisé des co-immunoprécipitations avec contrôle, en triplicat, afin de caractériser les petits ARN attachés à Otx2 (Annexe N). Cette méthode est réalisée séparément sur chacun des PC afin d'identifier un profil de petits ARN accrochés à Otx2 spécifique à l'un ou l'autre des PC. Cette même expérience permet de récupérer les ARN de plus de 200pb séparément des petits ARN. On pourra ainsi obtenir un réseau plus complet d'interaction d'Otx2 dans les deux types de PC. De plus, étant donné que les homéoprotéines peuvent être impliquées dans la régulation de la traduction, l'association d'Otx2 avec des longs ARN et des petits ARN – notamment les ARNm et les miARN, respectivement – pourra fournir des indices sur des cibles traductionnelles d'Otx2 (Dubnau & Struhl 1996; Rivera-Pomar *et al.* 1996; Niessing *et al.* 2002; Rödel *et al.* 2013). Otx2 serait ainsi associée à différentes étapes, depuis le contrôle de l'expression d'un gène jusqu'à la formation de la protéine et de ses divers variants (Fant *et al.* 2015).



## VI- 3. Cibles cellulaires d'Otx2

### VI- 3.a Cellules cibles d'Otx2

Chez l'adulte, le transfert d'Otx2 a été montré dans les cellules à parvalbumine du cortex visuel (Sugiyama *et al.* 2008). Des analyses d'hybridations *in situ* et d'immunomarquages d'Otx2 ont également révélé de l'Otx2 non-cellulaire-autonome dans les cellules à parvalbumine des cortex somato-sensoriel, auditif et cingulé, de l'hippocampe et de la BLA (Spatazza, Lee, *et al.* 2013). Otx2 est exprimée, durant le développement embryonnaire, dans des cellules gliales du système olfactif, mais son rôle et son transfert dans des cellules gliales n'avaient pas été étudiés (Mallamaci *et al.* 1996).

Notre étude montre qu'Otx2 est également transférée dans des cellules n'exprimant pas la parvalbumine et qui ne sont pas des neurones. En effet, Otx2 transfère dans les cellules épendymaires, et dans les astrocytes de la ZSV et du CMR.

Une caractérisation complète du transfert d'Otx2 dans la niche de la ZSV et du CMR permettrait de soutenir notre hypothèse du rôle des cellules de support dans la régulation de la neurogenèse. Des comarquages avec Iba-1, pour identifier les cellules microgliales, et Olig2, pour les oligodendrocytes, ont révélé qu'Otx2 ne transfère pas dans ces cellules au niveau du CMR (Figure 37). Concernant le transfert dans les progéniteurs de la ZSV, l'internalisation ou non d'Otx2 dans les cellules souches pourrait être montrée par co-immunomarquage avec Id1. Ce marqueur est fortement exprimé par les cellules souches, un peu moins dans les progéniteurs de type C et encore moins dans les neuroblastes (Nam & Benezra 2009). Concernant les progéniteurs de type C, il existe différents marqueurs. Nous n'avons pas réussi à mettre au point les marquages avec EGFR et Dlx2 (Doetsch *et al.* 2002; Pastrana *et al.* 2009). Nous pourrions également tester Ascl1 qui est un autre marqueur de ces cellules (Parras *et al.* 2004). Toutefois, peu d'Otx2 est observé dans le mur latéral, et des co-marquages avec Ki67 n'ont pas montré de colocalisation avec Otx2. Or, Ki67 est un marqueur de cellules en division, donc est exprimée par les cellules de type C et les neuroblastes (Ponti *et al.* 2013). Une autre méthode serait l'utilisation de la microscopie électronique afin d'identifier, grâce aux détails de cette technique, tous les types cellulaires et éventuellement sous types cellulaires internalisant Otx2. Il

existe en effet deux types de cellules épendymaires et les astrocytes sont hétérogènes (Mirzadeh *et al.* 2008; Bayraktar *et al.* 2015).

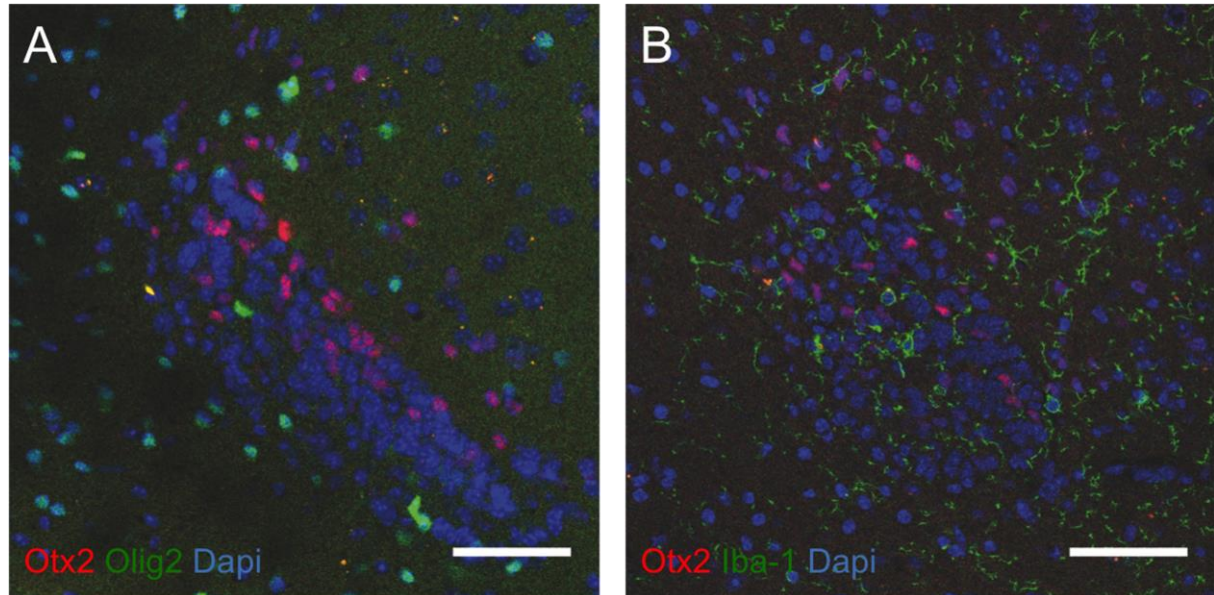


Figure 37 : Otx2 n'est pas internalisée par les oligodendrocytes et les microglies

(A) Olig2 marque le noyau des oligodendrocytes (vert) et Otx2 (rouge) ne colocalise pas avec Olig2. (B) Iba-1 est située dans les corps cellulaires et prolongements des microglies (vert) et Otx2 n'est pas dans les cellules Iba-1+. (A-B) Les noyaux sont marqués en bleu. La zone dense en noyaux correspond au CMR.

### **VI- 3.b La matrice extracellulaire comme mécanisme de reconnaissance des cellules cibles**

Dans le cortex visuel, il a été montré qu'Otx2 est internalisée spécifiquement dans les cellules parvalbumines grâce aux molécules de leur MEC. Otx2 interagit préférentiellement avec certains types de chondroïtines sulfates (CS-D et CS-E) *in vitro* (Beurdeley *et al.* 2012; Despras *et al.* 2013).

La caractérisation du transfert d'Otx2 dans la ZSV et le CMR pourra renforcer notre compréhension des mécanismes de reconnaissance des homéoprotéines et de leur internalisation spécifique. Ainsi, différentes expériences pourront mettre en lumière l'importance de la MEC pour le transfert d'Otx2 dans les cellules épendymaires et les astrocytes de la ZSV et du CMR. Des marquages de protéoglycans avec des CS-D et CS-E permettraient de renforcer l'hypothèse d'un rôle prépondérant de ces motifs de sulfatation dans la reconnaissance d'Otx2. L'injection de chondroitinase dans la ZSV et la quantification du marquage Otx2 sur coupe permettraient de montrer le rôle des chondroïtines sulfates dans le transfert d'Otx2 dans la ZSV (Beurdeley *et al.* 2012). En revanche, nous n'avons pas réussi à obtenir des quantifications correctes de l'intensité du marquage d'Otx2 dans cette région, étant donné que peu d'Otx2 transfère et que peu de cellules sont marquées par coupe.

Les PC sont une source de protéoglycans dans le LCS embryonnaire et certains sont encore exprimés chez l'adulte (Bueno & Garcia-Fernández 2016 et données des études transcriptionnelles des PC). Étant donné que les PC expriment ces molécules dans le LCS et que le mur ventriculaire est perméable et proche du LCS des ventricules, il est possible que la MEC très particulière de la ZSV provienne en partie des PC. En effet, les fractones sont particulièrement enrichies en protéoglycans. De plus, des facteurs comme le FGF2 peuvent transférer depuis le LCS dans la ZSV, potentiellement en association avec des molécules extracellulaires comme les protéoglycans (Kerever *et al.* 2007). L'étude des fractones pourrait permettre d'identifier des molécules impliquées dans le transfert d'Otx2. Dans un premier temps, des comarquages d'Otx2 avec la laminine ou d'autres molécules des fractones permettront de montrer si Otx2 est associé à ces structures. Ainsi, Otx2 pourrait interagir avec des molécules de la MEC dans le LCS, puis parvenir aux cellules cibles possédant des molécules de la MEC plus affines qui capturent l'Otx2 extracellulaire.

### **VI- 3.c Otx2 comme marqueur des astrocytes de la zone sous-ventriculaire et du courant de migration rostrale**

Les astrocytes sont des acteurs majeurs de la sécrétion de molécules de la MEC (Faissner & Reinhard 2015) et sont associés aux neuroblastes ainsi qu'aux vaisseaux sanguins dans la ZSV et le CMR (Shen *et al.* 2008; Whitman *et al.* 2009). Les astrocytes dans la ZSV sont souvent réduits à la population de cellules souches (cellules de type B1) alors que d'autres astrocytes ont été identifiés (Doetsch *et al.* 1997; Shen *et al.* 2008). La différence entre les populations, difficile à mettre en évidence, est basée majoritairement sur des études de morphologie et de localisation des astrocytes en question. Les expressions de Tnc et de Thbs4 suggèrent que les astrocytes de la ZSV et du CMR sont spécialisés (Jankovski & Sotelo 1996; Benner *et al.* 2013; Girard *et al.* 2014). Il n'existe pas, à ce jour, de différence entre les astrocytes de la ZSV, très peu décrits, et ceux du CMR. Il est donc nécessaire d'identifier des marqueurs permettant de classer facilement différents types d'astrocytes (Bayraktar *et al.* 2015).

Notre étude montre l'internalisation d'Otx2 dans les cellules épendymaires et les astrocytes de la ZSV, plus particulièrement dans la région dorsale dans laquelle on observe de nombreuses chaînes de neuroblastes, et dans les astrocytes du CMR qui est le réseau de migration des neuroblastes jusqu'aux BO (Doetsch & Alvarez-Buylla 1996; Shen *et al.* 2008). Les astrocytes dans la partie dorsale de la ZSV pourraient donc être spécialisés, comme ceux du CMR, afin de guider les neuroblastes et Otx2 pourrait alors être un marqueur de ces astrocytes supports de la neurogenèse. Otx2 pourrait notamment être internalisée dans les cellules tangentielles, décrites par Shen *et al.* (2008), qui étendent des processus dans le sens de migration des neuroblastes. La réalisation d'*in situ* Thbs4 ou Tnc, afin d'obtenir un marquage cellulaire, avec un immunomarquage d'Otx2 pourrait montrer une hétérogénéité des astrocytes ou bien montrer que tous les astrocytes responsables de la production de ces molécules internalisent Otx2. Le développement de marqueurs des sous-types d'astrocytes pourra permettre de purifier des astrocytes par FACS et de réaliser des études génomiques. Ainsi, la modification d'expression de Thbs4 et Tnc pourrait être assignée à un sous-type d'astrocyte.

## VI- 4. Régulation de la neurogenèse adulte par Otx2

### VI- 4.a Comparaison des études sur les modèles murins *Otx2-lox* et *scFv-Otx2*

Le développement de souris exprimant un anticorps scFv dirigé contre une homéoprotéine permet d'étudier spécifiquement le rôle de son transfert (Bernard *et al.* 2016; Lesaffre *et al.* 2007). L'expression d'Otx2 par les PC d'une part, et son transfert dans le LCS d'autre part (Spatazza, Lee, *et al.* 2013; Bernard *et al.* 2016), sont potentiellement tous les deux des régulateurs de la neurogenèse adulte.

La diminution de nouveaux neurones dans le BO des souris injectées avec la Cre-Tat est similaire entre la lignée *Otx2-lox* et la lignée *scFv-Otx2*, suggérant un effet majoritairement non-cellulaire-autonome d'Otx2 chez les souris *Otx2-lox*. L'analyse transcriptionnelle des PC après knockdown d'Otx2 montre toutefois le changement d'expression de nombreux facteurs pouvant impacter la neurogenèse. Des mécanismes de compensation pourraient être mis en place pour ne pas impacter la neurogenèse adulte, et seule la diminution de la sécrétion d'Otx2 serait responsable du changement de neurogenèse.

Différentes approches peuvent nous permettre de confirmer l'hypothèse d'un rôle purement non-cellulaire-autonome d'Otx2 chez les souris *Otx2-lox*. Nous avons prévu de comparer l'expression de *Thbs4* et de *Tnc* par RT qPCR et western blot sur des extraits de ZSV de souris *scFv-Otx2* injectées ou non avec la Cre-Tat. L'observation d'une augmentation de ces molécules, de la même manière que chez les souris *Otx2-lox*, suggérerait un mécanisme commun de diminution de la neurogenèse dans le BO observée dans ces modèles.

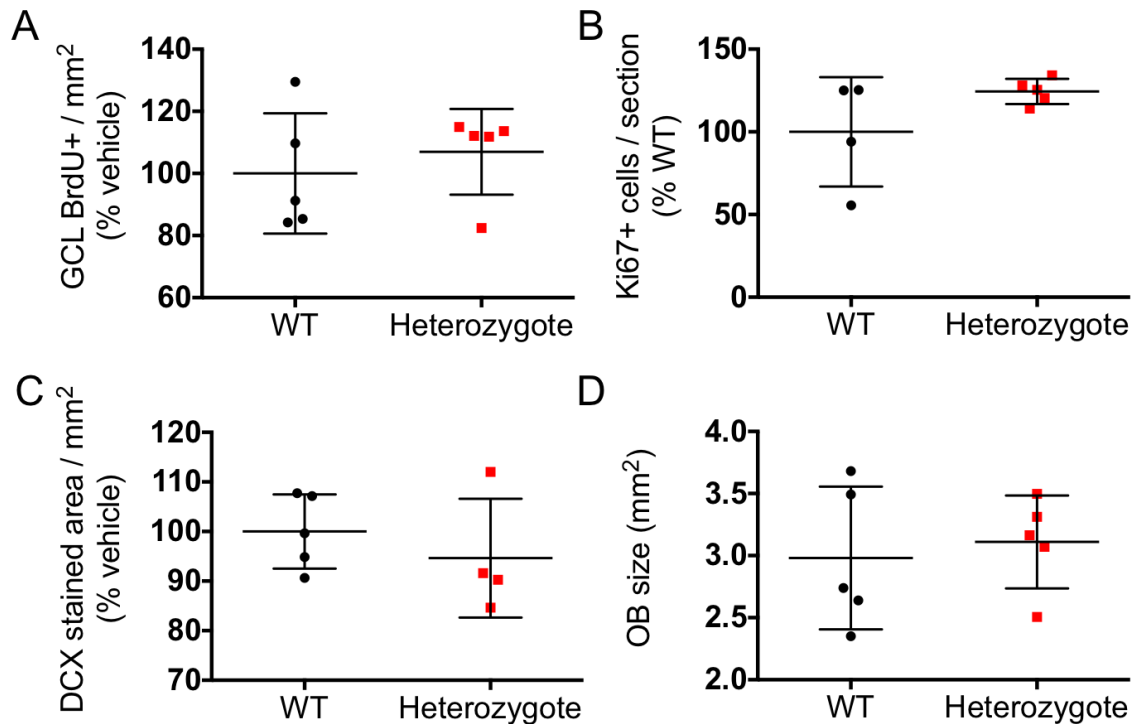
La diminution du nombre de nouveaux neurones après le traitement Cre-Tat est de 20%, ce qui est un effet assez mineur. Il existe différents types de nouveaux neurones et il est possible qu'un seul sous-type soit impacté par le knockdown d'Otx2 (Merkle *et al.* 2007). En effet, nous n'observons pas de diminution dans les glomérules, même si cette diminution pourrait être liée à un biais dû au peu de cellules comptées en comparaison à la zone granulaire. Il faudrait alors caractériser les différents sous-types d'interneurones. Une telle observation suggérerait alors un effet différent des astrocytes selon les différentes régions de la ZSV qui produisent préférentiellement certains types d'interneurones. A l'inverse, il est possible que les

progéniteurs de la ZSV soient tous régulés de la même manière et qu'un défaut de la MEC ait un impact global, mais pas drastique.

#### **VI- 4.b La diminution d'Otx2 doit être aiguë pour modifier la neurogenèse**

Les souris *Otx2<sup>+GFP</sup>* permettent de visualiser les sites d'expressions d'Otx2, mais constituent également un modèle de knockdown constitutif d'Otx2 (Acampora *et al.* 2009; Bernard *et al.* 2014).

L'analyse génomique des PC des souris *Otx2<sup>+GFP</sup>* a montré que moins de facteurs sont différentiellement exprimés dans un modèle de knockdown constitutif. Des expériences préliminaires suggèrent que ce modèle ne présente pas de défaut de neurogenèse dans le BO (Figure 40). La confirmation de ce résultat peut indiquer qu'il y a une compensation au niveau de la ZSV pour pallier la diminution du transfert d'Otx2. En effet, les travaux sur le cortex visuel ont montré que des souris hétérozygotes pour l'expression d'Otx2 ont une période critique retardée (données du laboratoire) suggérant que le knockdown constitutif est suffisant pour une diminution de la protéine dans le parenchyme. Ceci peut indiquer qu'Otx2 a une disponibilité plus importante au niveau de la ZSV (car plus proche du site d'expression) ou que ces régions répondent à des rôles différents d'Otx2 et peuvent être plus ou moins sensibles à la diminution d'Otx2.



**Figure 40 : Evaluation de la neurogenèse chez les souris *Otx2*<sup>+/GFP</sup>**

Divers paramètres ont été investigués pour évaluer la neurogenèse dans le modèle constitutif de knockdown d'*Otx2*. (A) En utilisant le protocole d'intégration (Partie V-2, Figure 1D, p.166), nous n'observons pas de diminution des nouveaux neurones générés dans le BO des animaux knockdown pour *Otx2* (107% des WT). (B) La prolifération a été évaluée par un marquage Ki67. Comme chez les souris *Otx2*-lox, il ne semble pas y avoir de changement de la prolifération dans la ZSV (124,5% des WT). (C) L'évaluation de la surface marquée par DCX dans le CMR suggère davantage que le knockdown constitutif d'*Otx2* n'impacte pas la neurogenèse adulte (94,6% des WT). (D) Afin de nous assurer que la possible absence de changement de neurogenèse n'est pas causée par un défaut de développement des BO, nous avons quantifié leur surface sans observer de changement (WT = 2,98 mm<sup>2</sup> ; Hétérozygote = 3,11 mm<sup>2</sup>).

## **VI- 4.c Etude de la régulation de la neurogenèse adulte par le transfert d'Otx2 dans la zone sous-ventriculaire**

Divers facteurs sont exprimés dans les PC et peuvent réguler la neurogenèse (Sawamoto *et al.* 2006; Bjornsson *et al.* 2015).

Notre étude a permis de montrer la présence d'Otx2 non-cellulaire-autonome dans la ZSV, et que bloquer le transfert d'Otx2 dans le LCS modifie la neurogenèse adulte. Ainsi, Otx2 s'ajoute aux molécules produites par les PC qui peuvent réguler la neurogenèse adulte. Toutefois, il manque la preuve directe que le transfert d'Otx2 dans la ZSV est responsable de la diminution de la neurogenèse. Pour cela, il faudra empêcher le transfert d'Otx2 spécifiquement dans la ZSV et l'utilisation du modèle murin scFv-Otx2 peut nous permettre d'attester du rôle direct de l'internalisation d'Otx2 sur la régulation de la neurogenèse.

L'injection de Cre-Tat dans la ZSV de souris scFv-Otx2 permettrait d'observer un effet local de la diminution de l'internalisation d'Otx2. On éviterait ainsi d'impacter toutes les régions internalisant Otx2 par les LCS. Malheureusement, des expériences préliminaires ont montré une très faible diffusion de la Cre-Tat dans la ZSV, entravant notre démarche. L'infusion de protéine Otx2 recombinante dans les souris Otx2-lox ou scFv-Otx2 permettrait de restaurer l'apport d'Otx2 spécifiquement dans la ZSV ou le CMR. Toutefois, l'infusion par pompes osmotiques ne permettra pas de couvrir la surface de la ZSV et de restaurer toute la neurogenèse. L'étude de la morphologie des neuroblastes et des chaînes de neuroblastes pourrait donner des indices sur leur migration en fonction des régions infusées ou non. Une autre solution serait le croisement des souris scFv-Otx2 avec des souris permettant l'expression de la Cre spécifiquement dans la ZSV et donc la sécrétion de l'anticorps dans cette région uniquement. Par exemple, les souris *Nestin-Cre<sup>ERT2</sup>* permettraient d'induire l'expression de la Cre dans les astrocytes, les cellules épendymaires et les cellules souches, et bloquer ainsi le transfert dans la ZSV tandis que des souris *DCX-Cre<sup>ERT2</sup>* permettront l'expression de l'anticorps dans la ZSV et le CMR (Doetsch *et al.* 1997).

Bien qu'Otx2 transfère dans les cellules de support de la ZSV, il est possible qu'une autre région du parenchyme internalisant Otx2 régule la neurogenèse. Si l'on identifie une région connue pour réguler la neurogenèse adulte à distance qui internalise Otx2, on pourra exprimer spécifiquement l'anticorps dans cette zone et étudier les conséquences sur la neurogenèse adulte. Par exemple, les neurones



sérotoninergiques du raphé projettent sur le mur ventriculaire (Tong *et al.* 2014). Si Otx2 est internalisé dans cette région, bloquer le transfert pourrait modifier la neurogenèse adulte.

#### **VI- 4.d Régulation de la neurogenèse par les cellules de supports**

Le concept de collaboration entre les cellules de supports de la niche est peu étudié et pourrait permettre de mettre en lumière d'autres mécanismes de régulation dans la ZSV. Notre étude suggère une régulation en plusieurs étapes. En effet, Otx2 est transféré des PC vers les astrocytes et les cellules épendymaires de la ZSV et du CMR pour ensuite moduler la neurogenèse.

Les cellules épendymaires régulent la neurogenèse adulte et pourraient participer à la composition de la MEC (Lim *et al.* 2000). Les cils des cellules épendymaires sont impliqués dans la formation de gradients dans le LCS et pourraient être impliqués dans la signalisation par Slit2 pour diriger les neuroblastes vers le CMR (Sawamoto *et al.* 2006). La diminution d'internalisation d'Otx2 dans ces cellules pourrait donc perturber le flux de LCS et modifier ainsi la signalisation perçue par les neuroblastes qui migrent anormalement.

Notre hypothèse est que le transfert d'Otx2 dans les astrocytes est un mécanisme majeur de la diminution de la neurogenèse après knockdown d'Otx2 dans les PC. Il serait donc intéressant de faire exprimer l'anticorps par les astrocytes non-souches. Si l'anticorps ne diffuse pas, cela permettra une capture spécifique d'Otx2 autour de ces astrocytes. Toutefois, le manque de gènes spécifiques à ces cellules nous empêche d'avoir cette approche de ciblage spécifique (Bayraktar *et al.* 2015).

Les astrocytes, les cellules épendymaires et même les PC pourraient également interagir avec les vaisseaux sanguins afin de réguler la neurogenèse adulte (Shen *et al.* 2008; Whitman *et al.* 2009). L'identification de facteurs de signalisation entre les cellules de support de la niche permettra de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la neurogenèse adulte. Par exemple, le facteur TGF- $\beta$ 1 est exprimé par les PC et régule négativement la prolifération *in vitro* (Wachs *et al.* 2006). Les vaisseaux sanguins peuvent également transduire la signalisation TGF- $\beta$ 1 (Pardali *et al.* 2010). Une modification de son expression dans les PC peut aussi impacter les vaisseaux sanguins pour modifier la régulation de la neurogenèse. Un autre exemple d'interaction implique la régulation de la niche par la MEC. Les vaisseaux sanguins

sont régulés par la MEC (Murakami 2012). Un changement d'expression des molécules de la MEC exprimées par les astrocytes pourrait alors impacter la neurogenèse en modifiant les propriétés des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Un changement d'expression des astrocytes pourrait donc modifier l'expression d'autres cellules de support et pas uniquement les propriétés des progéniteurs.

#### **VI- 4.e Examiner la neurogenèse en embryonnaire et dans l'évolution pour comprendre les fonctions d'Otx2**

Otx2 pourrait réguler la neurogenèse embryonnaire de manière non-cellulaire-autonome durant le développement précoce, en définissant les territoires du cerveau en développement (Annexe C). A ces stades, il n'existe pas d'astrocytes différenciés, semblables à ceux du cerveau adulte (Götz *et al.* 2016). Plus tardivement, Otx2 régule la neurogenèse embryonnaire de manière cellulaire-autonome en instruisant le développement de certaines régions du cerveau ou en régulant des facteurs – FGF – qui vont agir de manière non-cellulaire-autonome (Hoch *et al.* 2015). De la même manière, Johanson *et al.* (2013) ont montré que le knockdown d'Otx2 entraîne une modification de la prolifération et de l'apoptose des précurseurs du cortex cérébral, probablement due à une dérégulation de la signalisation par la voie Wnt provenant des PC. Les régions exprimant Otx2 durant le développement embryonnaire, et à plus forte raison les PC, sécrètent probablement Otx2, mais des rôles de son transfert local sur la régulation de la neurogenèse n'ont pas été étudiés. Ainsi, les changements observés après ce knockdown d'Otx2 pourraient être dus à une diminution de la protéine Otx2 dans le milieu extracellulaire. L'utilisation des souris scFv-Otx2 permettra de bloquer le transfert d'Otx2 via le LCS, comme dans notre étude, soit par expression dans les régions cibles d'Otx2 non-cellulaire-autonome chez l'embryon (Bernard *et al.* 2016). De telles études pourraient dévoiler un rôle non-cellulaire-autonome d'Otx2 chez l'embryon et également identifier des mécanismes communs à la neurogenèse embryonnaire et adulte (Götz *et al.* 2016).

En plus de comparer les données sur la neurogenèse embryonnaire et adulte chez la souris, une analyse à travers le prisme de l'évolution peut être envisagée. L'analyse dans différents modèles vertébrés de la neurogenèse adulte peut permettre de mieux comprendre ce processus et sa régulation. Tous les vertébrés étudiés présentent des PC, du LCS, expriment Otx2, notamment dans les PC comme chez la

souris et chez l'Homme, et ont une neurogenèse postnatale (Bueno & Garcia-Fernández 2016; Acampora *et al.* 2001; Paredes, Sorrells *et al.* 2016). L'étude d'autres modèles pourrait montrer une conservation du rôle d'Otx2 dans les PC et dans la régulation de la neurogenèse adulte.

## VI- 5. Mécanisme de régulation de la neurogenèse adulte par *Otx2*

### ***VI- 5.a Une réduction ou un défaut de migration des neuroblastes pourrait causer la diminution de neurogenèse***

Une modification du nombre de neurones nouvellement générés dans le BO peut être due à des mécanismes différents. En effet, la perturbation d'un signal peut impacter les cellules souches et modifier tout le lignage cellulaire, ou bien changer uniquement la migration des neuroblastes, sans impacter les cellules souches (Kokovay *et al.* 2012; Saghatelyan *et al.* 2004).

Nous avons réalisé différentes expériences afin de comprendre quelles populations permettant la formation de nouveaux neurones sont impactées par le knockdown d'*Otx2* dans les PC. La quantification de cellules BrdU<sup>+</sup> dans la ZSV 2 heures après injection de BrdU montre qu'il n'y a pas de modification de la prolifération au moment où sont générés les neuroblastes dans nos études sur l'intégration (3 semaines après l'injection de BrdU). Nous avons également réalisé des marquages Ki67 sur diverses expériences sans jamais observer de différences après knockdown d'*Otx2*. Par exemple, sur une des expériences d'intégration des neuroblastes dans les souris *Otx2-lox*, soit 36 jours après knockdown, nous avons quantifié par stéréologie le nombre de cellules Ki67 (Figure 38). Ceci suggère que la population des progéniteurs de type C, qui sont les cellules proliférant le plus, n'est pas impactée par le knockdown d'*Otx2*. La quantification directe de ces progéniteurs pourrait être réalisée par immunomarquage contre un marqueur de cette population. Si les cellules de type C ne sont pas modifiées, il semble peu probable que les cellules souches soient impactées. Nous avons également envisagé la possibilité d'une mort des progéniteurs. Des expériences préliminaires de marquage de la caspase-3 ou des essais TUNEL n'ont pas révélé de processus de mort dans la ZSV.

Des résultats préliminaires suggèrent une diminution de l'aire marquée par DCX – un marqueur cytoplasmique des neuroblastes – dans le CMR, qui pourrait refléter une diminution des neuroblastes dans cette région (Figure 39). De plus, une expérience préliminaire avec un paradigme expérimental permettant de quantifier les cellules en migration montre une diminution après knockdown d'*Otx2* dans les PC (Figure 39C, D). Nous réalisons actuellement des expériences afin de confirmer

l'hypothèse d'une diminution de neuroblastes rentrant dans le CMR comme cause de la diminution de nouveaux neurones dans le BO (Figure 40).

Une dernière possibilité est le défaut d'intégration des nouveaux neurones dans le BO, menant à une augmentation de la mort cellulaire dans le BO après knockdown d'*Otx2*. Si nos expériences ne permettent pas de confirmer qu'une migration anormale des neuroblastes est responsable de la diminution de la neurogenèse, nous pourrions réaliser des essais TUNEL sur le BO dans les expériences d'intégration.

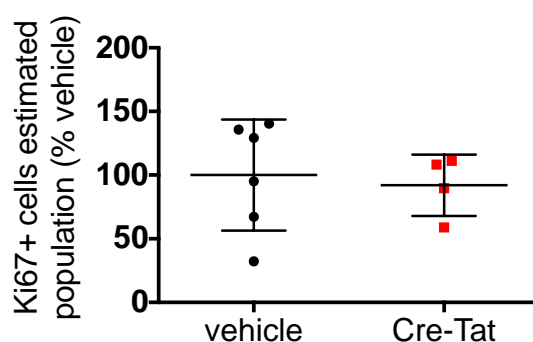
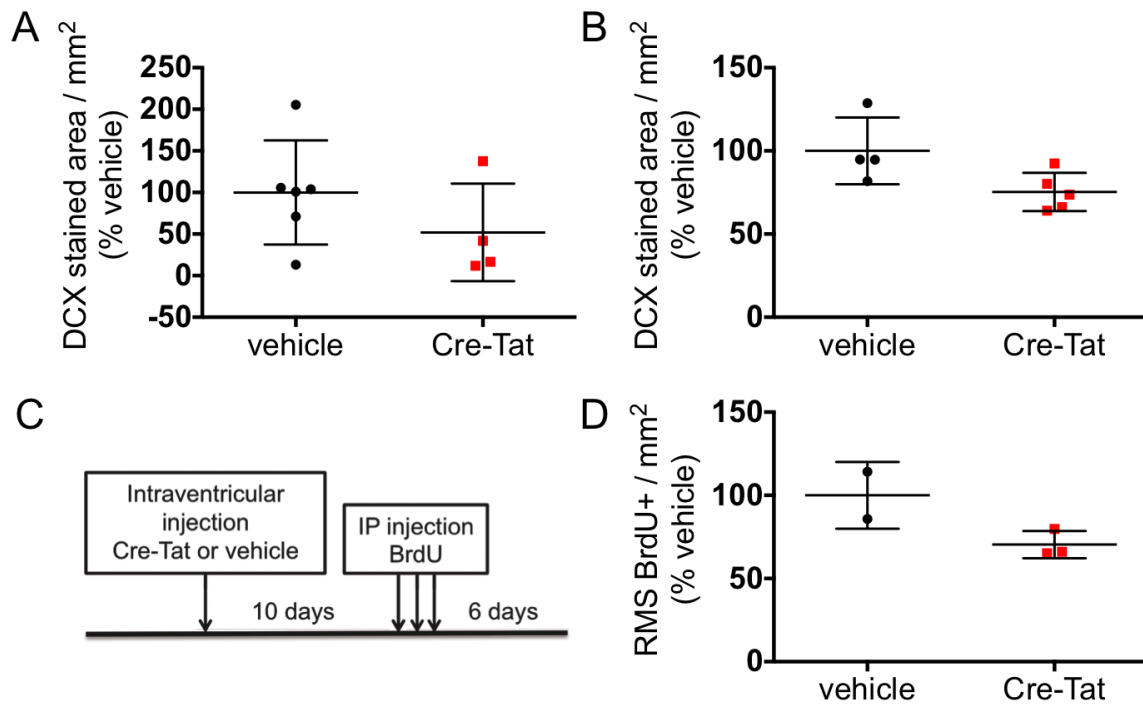


Figure 38 : La prolifération n'est pas modifiée après knockdown d'*Otx2* dans les PC

Une estimation de la population marquée par Ki67 a été réalisée par stéréologie 36 jours après knockdown d'*Otx2*. Chez des animaux *Otx2-lox* injectés avec la Cre-Tat présentant une diminution des nouveaux neurones générés dans le BO, l'estimation des cellules en prolifération, marquées par Ki67, est similaire à celle des animaux contrôle.



**Figure 39 : Potentielle diminution des neuroblastes après knockdown d'Otx2 dans les PC**

(A) La quantification de la surface marquée par DCX sur des montages en « wholomount » de la ZSV, qui permet de visualiser la surface du mur ventriculaire, suggère une diminution après 1 semaine de knockdown d'Otx2 dans les PC (52% des véhicules). (B) La même expérience de quantification de la surface marquée par DCX a été réalisée sur le CMR en coupe coronale. Les souris injectées Cre-Tat semblent avoir une diminution de la surface DCX+ dans le CMR 20 jours après knockdown d'Otx2 dans les PC (75,3% des véhicules). (C) Afin d'obtenir une quantification précise des neuroblastes, nous avons utilisé un troisième protocole d'évaluation de la neurogenèse. 10 jours après injection de la Cre-Tat ou du véhicule, des injections de BrdU ont été réalisées pendant 3 jours. Afin d'évaluer le nombre de neuroblastes en migration dans le CMR, les animaux ont été sacrifiés 6 jours après la dernière injection de BrdU. (D) Un résultat préliminaire utilisant ce protocole chez des souris Otx2-lox suggère une diminution du nombre de cellules BrdU+ dans le CMR après knockdown d'Otx2 (70,4% des véhicules).

### **VI- 5.b La matrice extracellulaire sécrétée par les astrocytes de support comme régulateur de la migration des neuroblastes**

Les études sur la MEC dans la neurogenèse adulte ont montré des rôles importants de ces molécules dans la régulation de la migration des neuroblastes.

*Thbs4* est spécifiquement exprimée par les astrocytes et un modèle de souris knockout de *Thbs4* montre une diminution de la neurogenèse adulte (Girard *et al.* 2014).

Nous montrons une augmentation de l'expression de *Thbs4*, mais aussi une diminution de la neurogenèse, ce qui suggère que la composition de la MEC doit être finement régulée afin de contrôler la migration des neuroblastes vers le BO (Figure 40). De plus, l'augmentation de l'expression de *Thbs4* supporte notre observation du transfert d'*Otx2* dans les astrocytes obtenue par immunomarquage.

Une description de la morphologie des astrocytes pourrait indiquer si le changement de MEC que l'on observe entraîne une modification du comportement de ces cellules de support. Elles pourraient en effet envahir les chaînes de neuroblastes et perturber ainsi leur migration (Belvindrah *et al.* 2007). Afin de confirmer que la modification de la MEC est un des mécanismes clés de la diminution de la neurogenèse adulte suite au knockdown d'*Otx2*, une expérience de rétablissement de la MEC peut être envisagée. La quantification de la neurogenèse après l'injection d'ARN interférents dans la ZSV, afin de contrer l'augmentation d'expression de *Thbs4* ou de *Tnc*, montrera si l'on rétablit ainsi la formation de nouveaux neurones.

Chez les espèces ne présentant pas de formation de chaînes de neuroblastes, des changements de la MEC pourraient être en cause. Ceci pourrait être confirmé par l'étude de la composition de la MEC des zones neurogéniques chez différentes espèces. Chez les poissons, qui présentent une neurogenèse soutenue, la MEC pourrait être favorable à la formation de nouveaux neurones tandis que chez l'Homme, l'environnement pourrait être moins permissif. On peut alors imaginer des thérapies combinées avec l'utilisation de nouvelles cellules et, en parallèle, des modulateurs du milieu extracellulaire accueillant ces nouvelles cellules afin de le rendre plus permissif. L'utilisation d'*Otx2*, afin de réguler l'expression de molécules de la MEC, pourrait permettre de constituer un environnement favorable à l'intégration de nouvelles cellules.

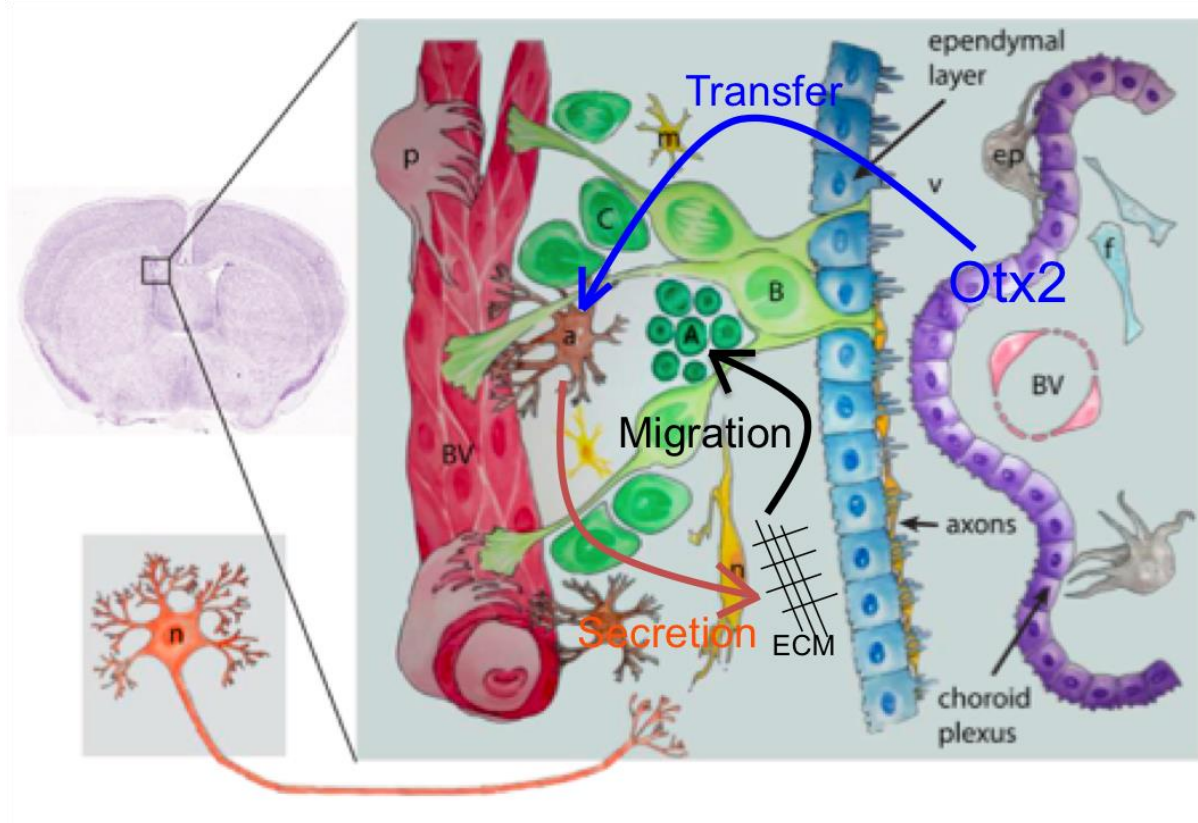


Figure 40 : Hypothèse du mécanisme d'action d'Otx2 pour la régulation de la neurogenèse adulte

Otx2 est transférée dans les astrocytes de la ZSV et du CMR. La diminution de son transfert provoque une augmentation de la sécrétion de molécules de la MEC. Le changement de composition de la MEC modifie alors la migration des neuroblastes, entraînant une diminution du nombre de nouveaux neurones générés dans le BO.



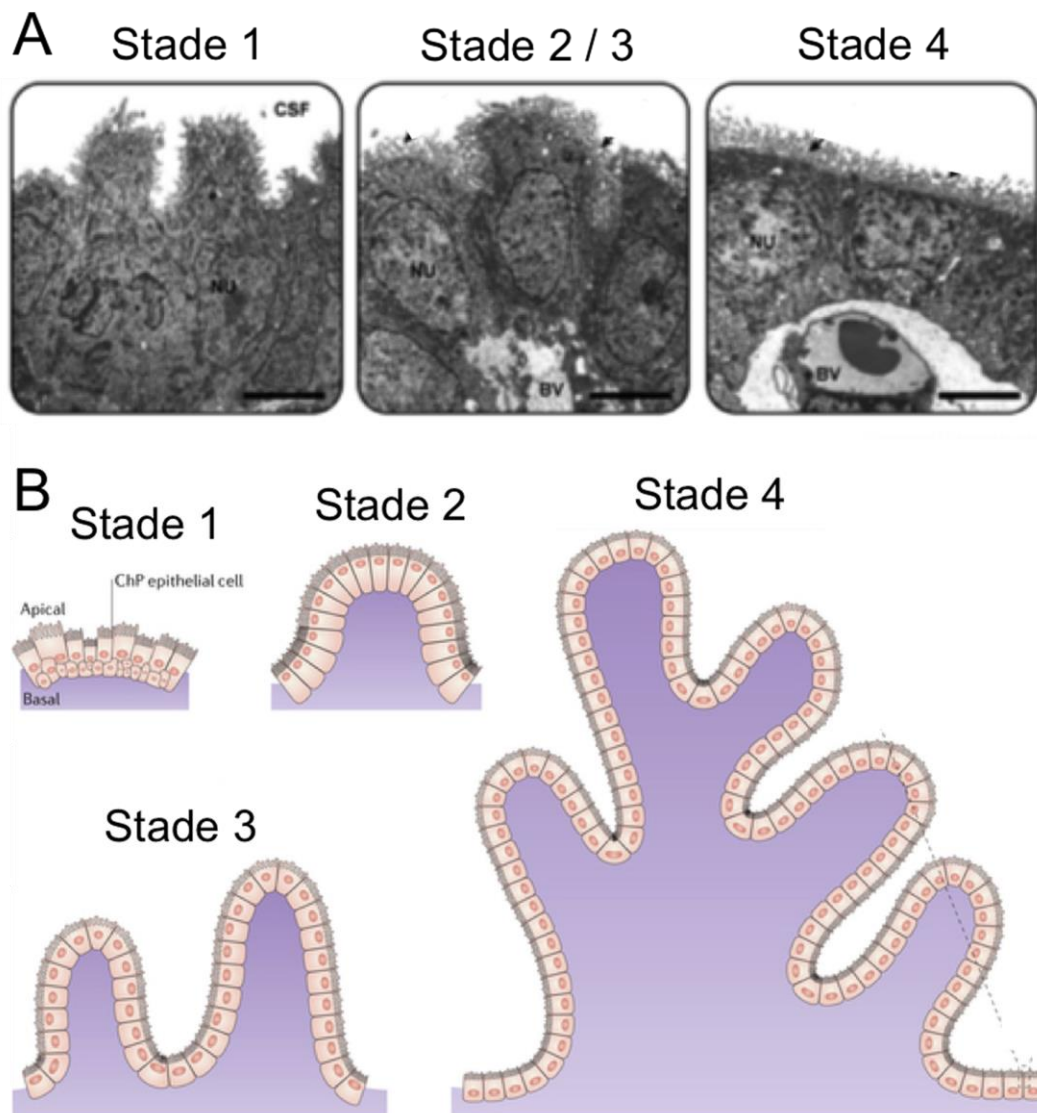


## **VII- Annexes**



## **Annexe A : Etapes du développement de l'épithélium des plexus choroïdes**

Au stade 1, les PC sont composés d'une couche d'épithélium pseudo-stratifié ayant déjà développé des microvillosités. Au stade 2, les cellules se transforment en une couche d'épithélium en colonne (cellules allongées) et le tissu commence à se replier pour former des villosités. Au stade 3, les cellules forment une couche d'épithélium cubique et les villosités se développent davantage. Au stade 4, l'épithélium présente de nombreuses villosités (Figure 41). Plus les PC se développent et augmentent leur surface, plus ils augmentent leur capacité de sécrétion du LCS. Les PC acquièrent leurs diverses fonctions peu de temps après leur formation et participent ainsi au développement du cerveau en sécrétant des facteurs importants pour la neurogenèse embryonnaire (Lun, Monuki, *et al.* 2015; Liddelow 2015).



**Figure 41 : Stades de développement des PC**

(A) Sur ces images de microscopie électronique des cellules des PC des ventricules latéraux aux différentes étapes de développement, on peut apprécier la formation de l'organisation des cellules épithéliales. NU, Nucleus ; BV, Blood Vessels. (B) Schéma du développement des PC. Au stade 1, les cellules épithéliales ne sont pas ordonnées et forment un épithélium pseudostratifié. Le noyau est en position centrale, le côté apical présente des microvillosités, mais on n'observe pas encore de villosités. Au stade 2, l'épithélium s'est organisé pour former une monocouche de cellules en colonne. Le noyau est en position apicale, les villosités apparaissent par endroits et les cellules possèdent du glycogène en abondance. Au stade 3, les cellules prennent leur morphologie cubique. Le noyau est en position centrale ou apicale et les villosités se multiplient. Au stade 4, le noyau est passé en position basale, les villosités se sont complexifiées et les cellules n'ont plus de glycogène. Ce composé pourrait avoir des propriétés nutritives pour le développement des PC ou entrer dans la composition des PC telle que les GAG de la membrane basale (Damkier *et al.* 2013) Illustrations de Liddelow (2015) et Lun, Monuki, *et al.* (2015).

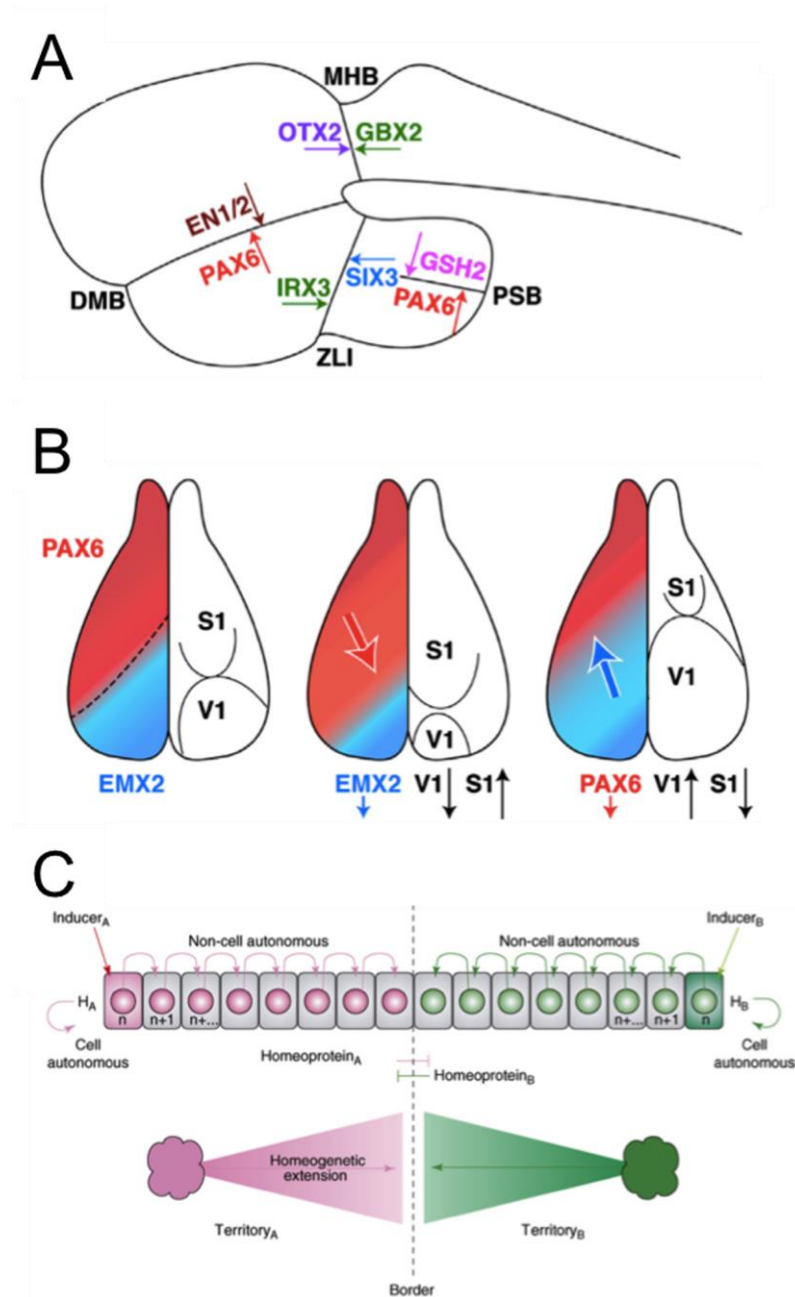
## **Annexe B : Découverte des homéoprotéines**

Les gènes homéotiques furent découverts chez la *Drosophile* à partir de mutations entraînant la transformation d'un segment en un segment homologue (totalement ou en partie). En effet, chaque segment est défini par l'expression d'une combinaison de gènes homéotiques. Par exemple, la surexpression dans le segment « tête » du gène *Antennapedia*, normalement exprimé dans les segments thoraciques, induit la transformation des antennes en pattes. Sur cette base, on dit que les antennes et les pattes sont des organes homologues et que la mutation est homéotique. Les gènes homéotiques appartiennent à la classe des homéogènes qui codent pour des facteurs de transcription de la classe des homéoprotéines. Les homéoprotéines sont caractérisées par leur domaine de fixation à l'ADN, l'homéodomaine lui-même encodé par l'homéoboîte. Tous les homéogènes, définis par la présence d'une homéoboîte, n'ont pas forcément une activité homéotique (Reichert & Simeone 1999; McGinnis & Krumlauf 1992).

## **Annexe C : L'expression des homéoprotéines définit un code pour la régionalisation du système nerveux central**

Durant le développement embryonnaire précoce, les homéoprotéines permettent de définir différents territoires dans le neuro-épithélium qui donneront les différents territoires du système nerveux central. Ainsi, l'expression de deux protéines dans deux sous-domaines se jouxtant permet de définir une barrière entre ces deux territoires (Figure 42A). Augmenter l'expression d'un facteur entraîne l'extension du territoire défini par cette homéoprotéine aux dépens de l'autre domaine (Figure 42B) (Prochiantz & Di Nardo 2015).

Une hypothèse est que la formation de ces frontières se fait par un mécanisme d'autoactivation et d'inhibition réciproque qui met en jeu la capacité de transfert des homéoprotéines (Figure 42C). Bien que limitée par le milieu extracellulaire, la diffusion des homéoprotéines pourrait être nécessaire pour la formation de barrières nettes et reproductibles entre deux domaines (Kasatkin *et al.* 2008; Quiñinao *et al.* 2015).



### Figure 42 : Le transfert des homéoprotéines régule la formation des territoires du système nerveux central

(A) L'expression de différentes homéoprotéines est importante afin de définir les barrières entre territoires du système nerveux central en développement. Quatre couples sont montrés sur ce schéma, notamment les zones d'expression d'*Otx2* et de *Gbx2*, d'où résulte la formation de la barrière entre les cerveaux moyens et postérieurs. (B) Une perte de fonction d'une homéoprotéine entraîne une extension de la région définie par la seconde homéoprotéine (S1 : cortex somato-sensoriel, V1 : cortex visuel). (C) Un modèle de cette régulation de la formation des territoires nécessite le transfert de l'homéoprotéine pour activer son expression dans la cellule voisine. La barrière entre deux territoires se forme alors grâce à un mécanisme d'autoactivation de chacune des homéoprotéines et d'inhibition réciproque. Illustrations de Prochiantz & Di Nardo (2015) (A, B) et Brunet *et al.* (2007) (C).

## **Annexe D : Les homéoprotéines régulent la neurogenèse embryonnaire en coopération avec des voies métaboliques classiques**

Durant le développement plus tardif du système nerveux central, le transfert des homéoprotéines permet la migration des progéniteurs ainsi que le guidage axonal. Ceci pouvant faire appel à la capacité des homéoprotéines à fournir une information spatiale aux cellules (comme précédemment, durant la régionalisation du système nerveux central). Pour réguler ces processus, les homéoprotéines interagissent avec des voies de signalisation plus classiques.

Par exemple, la sécrétion des homéoprotéines En1 et En2 dans le milieu extracellulaire du tectum entraîne la formation d'un gradient de concentration. Ceci permet le guidage approprié des axones en fonction de la position du corps cellulaire dans la rétine. La fonction d'En1/2 se fait en coopération avec la signalisation par l'EphrinA5 en potentialisant son action (Brunet *et al.* 2005; Wizenmann *et al.* 2009; Stettler *et al.* 2012).

Plus récemment, des travaux ont suggéré que la croissance axonale nécessite l'homéoprotéine Vax1. Cette fois-ci, la fonction de Vax1 s'exerce en coopération avec la signalisation par Slit (Kim *et al.* 2014).

Enfin, le transfert de Pax6 dans les précurseurs d'oligodendrocytes régule leur migration dans la partie ventrale du tube neural de poulet en coopérant avec la signalisation par Netrin (Di Lullo *et al.* 2011).

Ainsi, il existe de nombreux exemples de coopération des homéoprotéines avec les voies de signalisation classiques. Il a été proposé que les homéoprotéines, apparues très tôt durant l'évolution, sont des morphogènes permettant de fournir des indications spatiales aux cellules. Sont ensuite apparues les voies de signalisation classiques, propres aux vertébrés, qui interagissent avec ces morphogènes pour fournir une signalisation robuste et reproductible (Brunet *et al.* 2007).



## **Annexe E : Séquence d'Otx2**

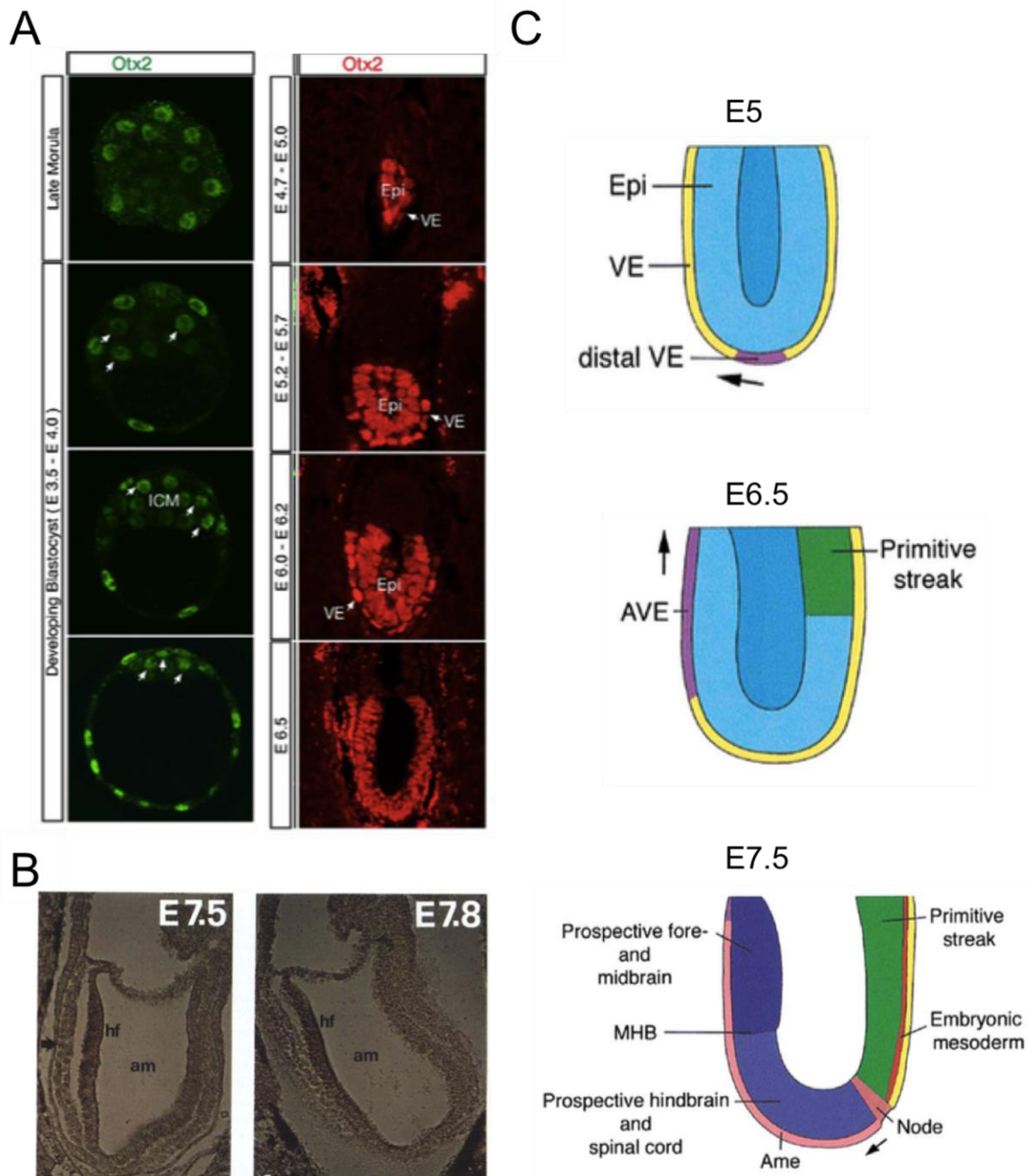
Chez la souris, *Otx2* est localisée sur le chromosome 14 et composé de 6 exons. Il existe divers isoformes d'ARNm pouvant exercer des fonctions différentes et spécifiques. Ainsi, l'expression d'une isoforme peut être très régulée dans le temps et deux isoformes exprimées en même temps n'auront pas le même rôle. Les deux isoformes les plus couramment observées produisent des protéines de 31.6 et 32.3 kDa (Courtois *et al.* 2003; Acampora *et al.* 2009; Liu *et al.* 2013).

La séquence présente une similarité de 100% entre la souris et l'Homme (Beby & Lamonerie 2013).

## **Annexe F : Otx2 induit la partie antérieure du cerveau durant le développement embryonnaire précoce**

*Otx2* est nécessaire au développement embryonnaire du domaine antérieur de l'embryon. En effet, l'inactivation d'*Otx2* chez la souris (*Otx2*<sup>-/-</sup>) est létale à E8.5 et ces embryons présentent un phénotype où la tête est absente (Matsuo *et al.* 1995). Chez ces mutants, l'absence de tête est due à une anomalie dans la formation de l'axe antéro-postérieur durant la gastrulation (Zakin *et al.* 2000). *Otx2* est exprimée avant la gastrulation (avant E6) puis dans l'endoderme viscéral et l'épiblaste où elle permet d'induire l'antériorisation (Figure 43). L'expression d'*Otx2* dans l'endoderme viscéral est nécessaire à l'induction de l'expression d'*Otx2* dans l'épiblaste (Boyl, Signore, Annino, *et al.* 2001).

Après la gastrulation, son expression est décrite dans le mesendoderme axial et dans la partie rostrale de la plaque neurale (composée d'ectoderme) (Figure 43). L'expression d'*Otx2* est alors nécessaire afin de maintenir l'identité antérieure du territoire (Boyl, Signore, Annino, *et al.* 2001; Acampora *et al.* 2001).



**Figure 43 : Expression d'Otx2 durant le développement embryonnaire précoce**

A) Otx2 est détecté par immunomarquage dès le stade morula tardive et dans les blastocystes. Au début de la gastrulation (dès E5), Otx2 est présent dans l'épiblaste (Epi) et dans l'endoderme viscéral (VE). L'expression d'Otx2 est ensuite (E6.5) confinée à la partie la plus antérieure de l'hypoblaste nommée endoderme viscéral antérieur (AVE), et dans tout l'épiblaste. (B) A la fin de la gastrulation (E7.5), Otx2 est exprimé dans la partie la plus antérieure de l'ectoderme qui formera les cerveaux antérieurs et moyens. Otx2 est également détectée dans le mesendoderme axial (flèche) (C) Schéma des stades de gastrulation. ICM, Inner Cell Mass ; Epi, Epiblast ; VE, Visceral Endoderm ; Hf, Headfold ; Am, Amniotic Cavity ; MHB, Mid-Hindbrain Boundary. Illustration adaptée Acampora *et al.* (2013) (A), Malacci *et al.* (1996) (B), et Boyl, Signore, Annino, *et al.* (2001) (C).

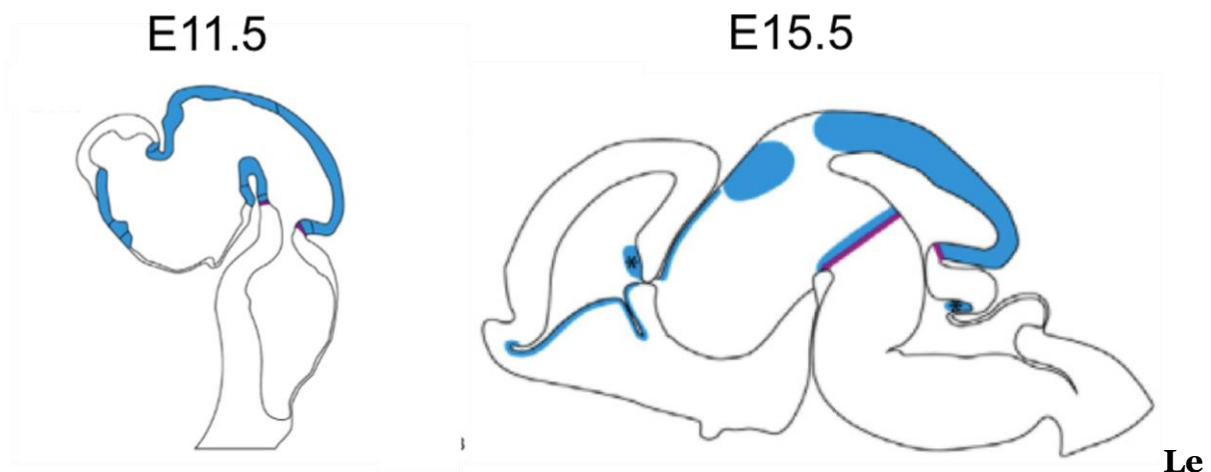
## Annexe G : *Otx2* permet la régionalisation du cerveau et la spécification des progéniteurs

L'expression d'*Otx2* continue dans le cerveau antérieur et moyen permettant de définir la barrière cerveau moyen-cerveau postérieur. En effet, tandis qu'*Otx2* est exprimé dans la partie antérieure du système nerveux central, *Gbx2* permet de spécifier la partie postérieure du cerveau (Figure 42A) (Joyner *et al.* 1999; Wassarman *et al.* 1997).

Des délétions d'*Otx2* à E7.5 et E9.5 entraînent également des malformations de la tête et une réduction du territoire du cerveau antérieur, respectivement, soulignant l'importance de l'expression d'*Otx2* pour le développement du cerveau après la gastrulation (Fossat *et al.* 2006).

## Annexe H : *Otx2* régule la neurogenèse embryonnaire

A des stades plus tardifs de développement, l'expression d'*Otx2* continue dans certaines zones des cerveaux antérieur et moyen et on observe un début d'expression dans le cervelet (Figure 44) .



**s paramètres nécessaires sont manquants ou erronés.**

### Figure 44 : Expression d'*Otx2* dans le cerveau en développement

Les territoires d'expression d'*Otx2* sont indiqués en bleu et la barrière cerveau moyen-postérieure est indiquée par une ligne violette. A E11.5, *Otx2* est exprimée dans le télencéphale ventral et le diencéphale. A 15.5, *Otx2* est encore observée dans le télencéphale ventral, mais son expression se restreint encore dans le diencéphale. Un

début d'expression dans le cerveau postérieur apparaît au niveau du futur cervelet (Prochiantz & Di Nardo 2015).

### ***Otx2 régule la neurogenèse du cerveau antérieur***

A E10, *Otx2* est exprimé dans le cerveau antérieur à l'exception des renforcements préoptiques. A E11, son expression disparaît dans la partie dorsale du télencéphale qui donnera le cortex (Hoch *et al.* 2015).

Une étude a permis de comprendre le rôle d'*Otx2* dans la spécification et la neurogenèse du télencéphale ventral (vers E9). Cette zone qui produit notamment les interneurons du cortex et du striatum est à l'origine des ganglions de la base.

Dans le télencéphale, *Otx2* est exprimé dans le centre de structuration rostral (CSR, rostral patterning center en anglais, également appelé plaque commissurale) (Figure 45), le télencéphale ventral (composé des éminences ganglionnaires, des aires préoptiques et du septum) et le télencéphale dorso-caudal (comprenant les PC des ventricules latéraux et du 3<sup>e</sup> ventricule).

En utilisant des marqueurs des différentes populations de neurones générées (hybridation *in situ* et profilage transcriptionnel) dans ces zones après knockdown à E8.5, ils ont pû montrer qu'*Otx2* influence de manière différente les progéniteurs des différentes régions du télencéphale.

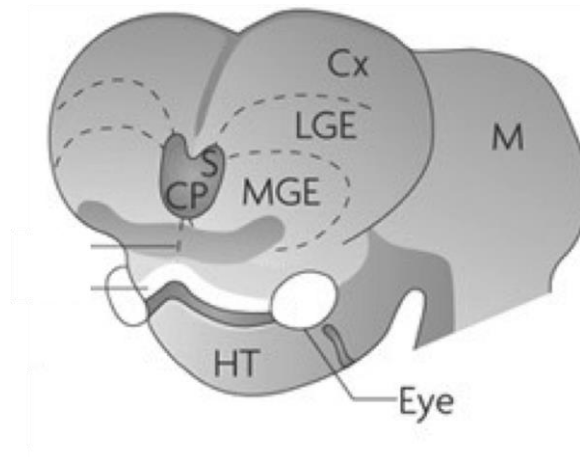
Ainsi, dans la CSR, l'expression d'*Otx2* permet de réguler l'expression des FGFs, car le knockdown entraîne une augmentation du domaine d'expression des FGFs. On observe alors des marqueurs de population des cerveaux moyens et postérieurs dans le télencéphale suggérant que les progéniteurs n'ont plus la même identité. *Otx2* est donc requis pour maintenir l'identité des progéniteurs en régulant l'expression des FGFs.

*Otx2* permet également de spécifier l'éminence ganglionnaire médiane ventrale, car le knockdown entraîne l'augmentation des marqueurs de l'aire préoptique (eg : *Slit2*, *Dbx1*) dans cette zone et une diminution de ses marqueurs spécifiques (eg : *Tal2*, *brevican*).

Dans l'éminence ganglionnaire médiane, *Otx2* promeut l'oligodendrogenèse et la neurogenèse, car on observe une diminution de marqueurs de ces progéniteurs après knockdown (eg : *Olig2*, *Robo2*, *Gbx2*). De plus, concernant la neurogenèse, *Otx2* semble réguler aussi bien la génération des progéniteurs que la maturation des neurones en régulant l'expression de gènes impliqués dans l'un ou l'autre de ces

processus (eg : Répression de *Hes1* et *Id4* pour la formation de neurones et activation de *Arx* et *Dlx1* pour leur maturation).

Enfin, *Otx2* permet la génération des neurones cholinergiques issus de l'éminence ganglionnaire médiane ventrale et de l'aire préoptique comme le knockdown entraîne une diminution du nombre de ces neurones (Hoch *et al.* 2015).



**Figure 45 : Localisation du centre de structuration rostral**

Schéma du cerveau de souris en développement montrant la localisation du CSR (CP) en avant du cerveau antérieur. S : Septum, MGE : Medial Ganglionic Eminence, LGE : Lateral Ganglionic Eminence, CX : Cortex, M : Midbrain, HT : Hypothalamus. Illustration de Rakic (2009).

### ***Otx2* régule la neurogenèse du cerveau moyen et du cervelet**

Dans le cerveau moyen, l'expression d'*Otx2* est détectée dans le tectum (futurs colliculus) de E9.5 à E11.5 puis elle est réduite à E12.5 dans la partie externe. A E14.5, *Otx2* est détectée dans le tectum caudal près des ventricules. A E16.5, le pattern d'expression est établi et se maintiendra en postnatal. *Otx2* est alors détectée dans la partie externe qui donnera les colliculus supérieurs et dans la partie ventriculaire caudale qui forme les colliculus inférieurs. L'expression d'*Otx2* dans le cervelet commence à E14.5 et se maintiendra chez l'adulte (Mallamaci *et al.* 1996).

Des knockdown d'*Otx2* à E10.5, E12.5, E14.5 et E16.5 ont démontré son rôle dans le développement du cerveau moyen et du cervelet. Dans le cerveau moyen ventral, le knockdown d'*Otx2* à E10.5 et à E12.5 entraîne une réduction du nombre de neurones dopaminergiques à E18.5 qui n'est pas due à des défauts de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose. *Otx2* est donc nécessaire à la différenciation des neurones

dopaminergiques et à E14.5 *Otx2* cesse d'être exprimée dans le cerveau moyen ventral.

Les embryons ayant subi un knockdown à E12.5 présentent des colliculus inférieurs peu développés, sans partie médiane, à P10. Ces animaux développent également une structure similaire à du cervelet à la place d'une partie du cerveau moyen médian (qui deviendra le colliculus supérieur). Les auteurs ont pu montrer que cette modification est due à un changement d'identité de cette zone du cerveau moyen et non pas à une extension du domaine du cerveau postérieur (défini par *Gbx2*, voir ci-dessus). Ainsi *Otx2* est encore nécessaire à l'identité de ces progéniteurs. Un knockdown à E14.5 entraîne également des malformations du colliculus inférieur, mais dans une moindre proportion. Des embryons avec un knockdown à E10.5 montrent une diminution du nombre de cellules en prolifération (marquées Ki67) dans le cerveau moyen dorsal, pouvant expliquer la diminution du développement du colliculus inférieur.

A E16.5, le knockdown d'*Otx2* n'entraîne pas de malformation du cerveau moyen, mais un retard de développement du cervelet postérieur.

Ce travail a permis de confirmer des résultats montrant qu'*Otx2* est nécessaire au maintien du cerveau moyen et au développement du cervelet, mais également de souligner les rôles très divers d'*Otx2*. Ainsi, *Otx2* semble réguler la prolifération dans le cerveau moyen dorsal pour le développement des colliculus inférieurs, mais pas dans le cerveau moyen ventral où *Otx2* régule la différenciation des progéniteurs des neurones dopaminergiques (Fossat *et al.* 2006).

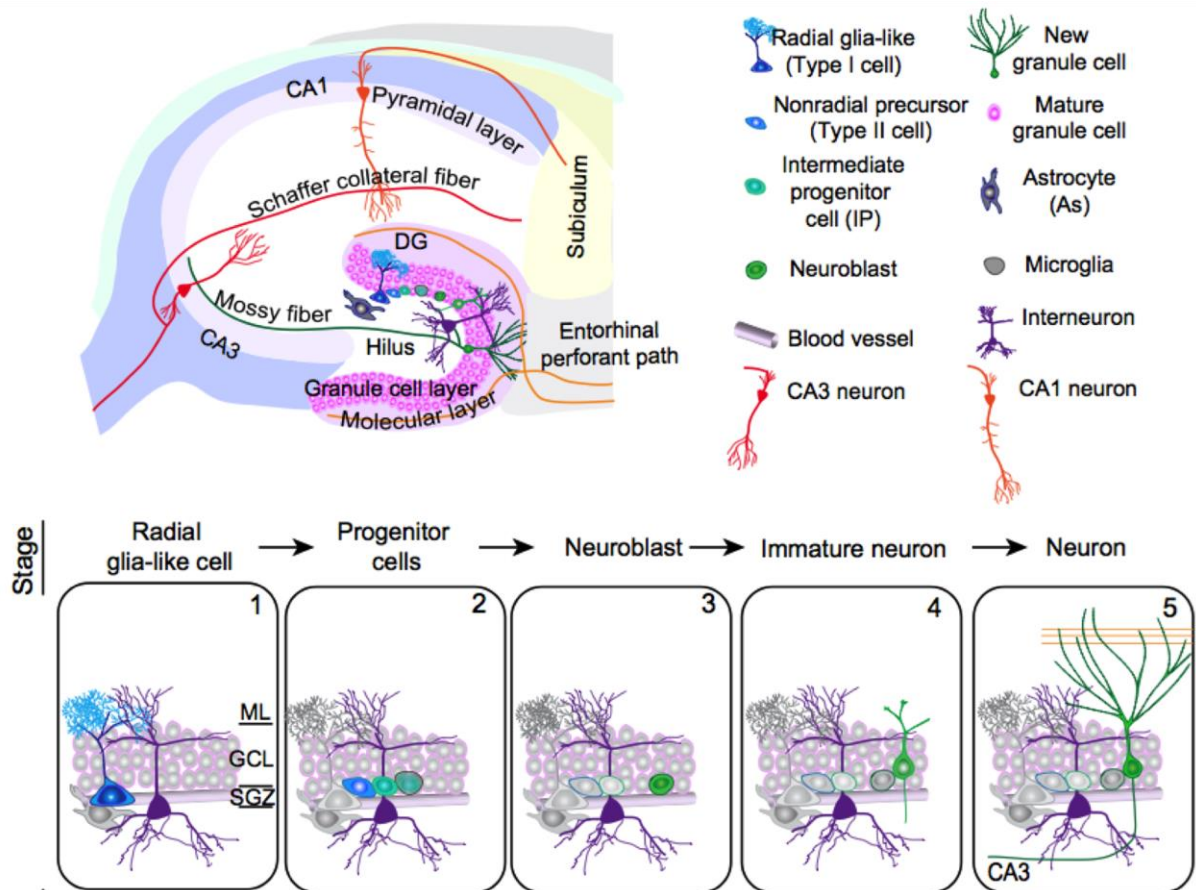
### ***Otx2 régule la formation des premières voies axonales***

*Otx2* peut contrôler des processus plus tardifs que la génération des neurones et notamment leur maturation et la formation de neurites. Ainsi, il a été montré que l'expression d'*Otx2* régule la longueur et la densité des neurites formées dans des modèles *in vitro* de neurones de la rétine, de neurones thalamique (E12.5) et de neurones cérébelleux (P5) (Nguyen-Ba-Charvet *et al.* 1998).

## **Annexe I : Neurogenèse adulte dans l'hippocampe de souris**

La neurogenèse adulte dans l'hippocampe permet la formation de nouveaux neurones excitateurs dans la couche granulaire du gyrus dentelé. Contrairement à la ZSV dont les progéniteurs migrent dans le BO, les progéniteurs et les nouveaux neurones du gyrus dentelé sont situés dans la même zone (Figure 46). Toutefois, la cascade de formation de nouveaux neurones est préservée avec des cellules neurales formant des progéniteurs intermédiaires qui se divisent rapidement pour amplifier le pool et des neuroblastes qui vont s'intégrer dans le réseau déjà en place (Kriegstein & Alvarez-Buylla 2009).

Le gyrus dentelé de l'hippocampe est une structure impliquée dans l'encodage de l'apprentissage spatial et associatif et de la mémoire tandis que le système olfactif est impliqué dans le décodage de l'information olfactive. Le rôle de la neurogenèse est mieux compris dans l'hippocampe et elle est impliquée dans la mémorisation et la discrimination de patterns (Konefal *et al.* 2013).



**Figure 46 : Neurogenèse adulte dans l'hippocampe**

Ces schémas permettent de visualiser la localisation des cellules depuis le stade cellule souche jusqu'à l'intégration dans le réseau. Les cellules souches de l'hippocampe se situent dans la zone sous-granulaire du gyrus dentelé. Elles produisent des neurones glutamatergiques qui s'intégreront dans la couche des cellules granulaires du gyrus dentelé. La séquence de formation des neurones est similaire à celle de la ZSV. Les cellules souches (Radial glia-like cells) (1) vont produire des cellules progénitrices (2) qui se divisent rapidement puis se différencient des neuroblastes (3). Ces cellules migrent dans la couche de cellules granulaires et forment des neurones immatures (4) qui pourront s'intégrer et former des neurones matures (5). De manière similaire à la ZSV, les cellules nouvellement générées pourront soit s'intégrer, soit entrer en apoptose. La différence majeure entre ces deux zones de neurogenèse est le type de neurones produits : glutaminergique dans l'hippocampe et GABAergique dans le BO. DG, Dentate Gyrus ; ML, Molecular Layer ; GCL, Granule Cell Layer ; SGZ, SubGranular Zone. Illustration de Ming & H. Song (2011).



## **Annexe J : Les intégrines sont les principaux récepteurs pour la transduction des signaux provenant de la matrice extracellulaire**

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires et constituent les principaux récepteurs de la MEC. Ils permettent de moduler l'interaction d'une cellule avec la MEC, mais également de transduire des signaux en s'associant à des protéines kinases. Ils interagissent dans le milieu extracellulaire avec, notamment, le collagène, la laminine et la fibronectine. La signalisation engagée sera différente si les intégrines lient la laminine ou la fibronectine. Il est ainsi possible pour la MEC de réguler la prolifération et la différenciation cellulaire directement, sans nécessiter la capture de molécules de signalisation (Wojcik-Stanaszek *et al.* 2011).

Les intégrines peuvent également interagir entre elles pour permettre l'adhésion entre cellules. Ce sont des hétérodimères composés de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , et comme il existe diverses versions de ces sous-unités, il y a 23 combinaisons de récepteurs intégrines chez l'Homme. Ainsi, en plus de la différence de transduction selon la molécule reconnue, cette différence de combinatoire accroît la diversité des signaux transduits (Faissner & Reinhard 2015). Il est également possible que ces récepteurs forment des dimères ou soient agrégés dans des sous-domaines avec d'autres récepteurs permettant une signalisation synergique (Wojcik-Stanaszek *et al.* 2011).

La ZSV est régulée par ces récepteurs de la MEC. L'intégrine VCAM-1, présent au niveau du cil des cellules souches, est nécessaire pour maintenir la structure en pinwheel importante pour la régulation des propriétés des cellules souches. (Kokovay *et al.* 2012). Une autre intégrine,  $\alpha 6$ , permet d'ancrer les progéniteurs de type C près des vaisseaux sanguins. Bloquer cette intégrine entraîne un déplacement des progéniteurs qui s'éloignent des vaisseaux sanguins. On observe également une perturbation de la prolifération de ces progéniteurs, démontrant l'importance de la MEC et des intégrines dans la régulation de la neurogenèse (Shen *et al.* 2008).

## **Annexe K : Les métalloprotéases sont des modulateurs de la matrice extracellulaire et de sa signalisation**

Les métalloprotéases clivent les protéines de la MEC, les récepteurs de la surface membranaire et les facteurs de croissance. Les conséquences de cette activité protéolytique sont alors un changement des contraintes physiques de la MEC, telles que la diffusion de molécules dans la MEC, et la libération de facteurs de signalisation qui étaient soit séquestrés dans la MEC, soit générés à partir d'une molécule de la MEC (Wojcik-Stanaszek *et al.* 2011).

## **Annexe L : L'émergence d'un nouveau domaine de recherche sur la diversité des cellules gliales**

Les astrocytes sont une classe de cellules gliales qui ont de nombreux rôles dans le système nerveux central. Tandis que les oligodendrocytes forment des gaines de myéline autour des axones afin d'augmenter la propagation du potentiel d'action le long de l'axone et que les cellules microgliales surveillent l'état immunitaire, les astrocytes ont été définis en premier lieu comme des cellules de support métabolique pour les neurones (Ma *et al.* 2005). Cette vue « neuro-centrée » est à ce jour remise en question, car des études montrent des rôles plus atypiques des cellules gliales et soulignent une hétérogénéité spatiale (Marques *et al.* 2016; Bayraktar *et al.* 2015). Ainsi les astrocytes de différentes régions pourraient ne pas être interchangeables, mais spécialisés. Le terme « astrocyte » regroupe ainsi les cellules qui participent à l'activité synaptique et la formation des synapses, les cellules formant des pieds astrocytaires impliqués dans la formation de la barrière hémato-encéphalique et les cellules souches neurales. La diversité des rôles cités ci-dessus souligne le manque de connaissance de cette classe de cellules et on peut s'attendre à découvrir davantage de fonctions et de sous-types d'astrocytes. Il reste notamment à déterminer si les fonctions décrites peuvent être partagées par tous les astrocytes, et s'il existe une ségrégation spatiale et temporelle, avec un changement de fonction des astrocytes au cours de la vie. Une piste intéressante pour comprendre l'hétérogénéité spatiale est l'étude de l'origine des astrocytes. En effet, durant le développement embryonnaire, la formation de sous-types de neurones dépend de la région et du moment de

génération et ces paramètres pourraient s'appliquer à la génération des astrocytes (Bayraktar *et al.* 2015).

## **Annexe M : Le manque de marqueurs moléculaires freine la compréhension de l'hétérogénéité des astrocytes**

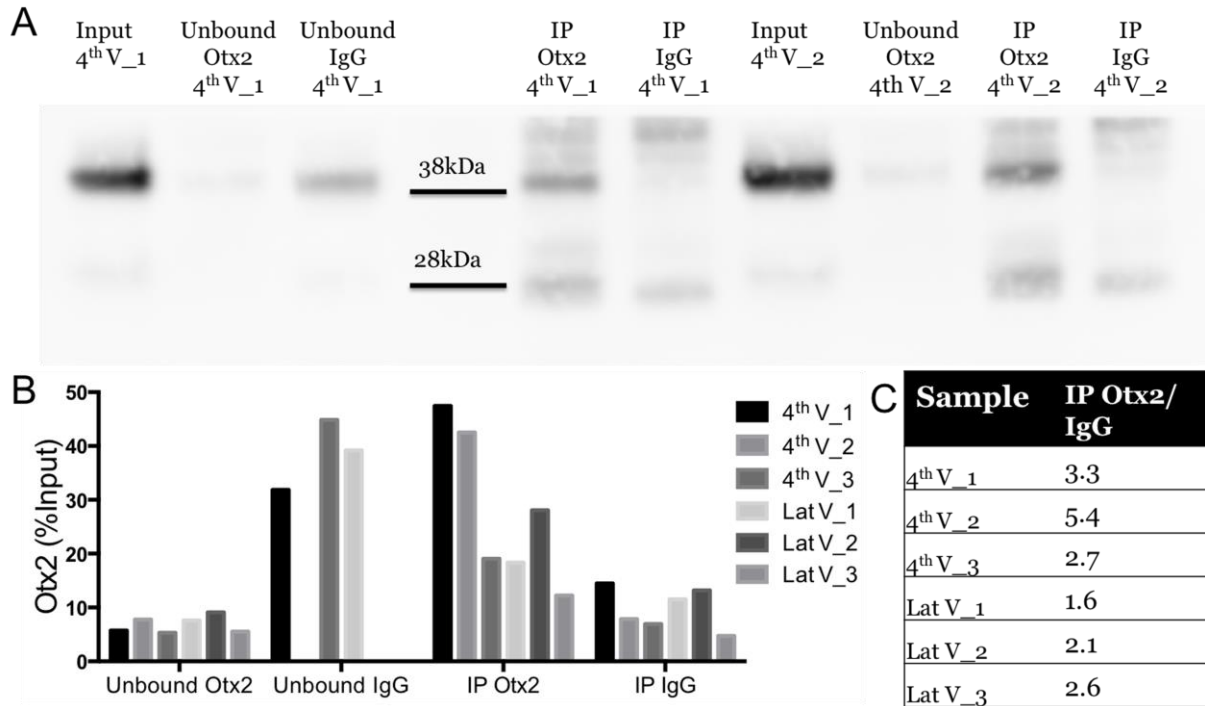
Un problème majeur dans le développement de l'étude de l'hétérogénéité des astrocytes est le manque de marqueurs moléculaires spécifiques à un sous-type d'astrocytes. En effet, s'il est aisé de distinguer les cellules souches des neurones ou des oligodendrocytes, les astrocytes matures expriment de nombreux marqueurs communs avec les cellules souches et il n'existe pas un seul marqueur qui soit spécifique. Il faut donc utiliser des combinaisons de marqueurs, ce qui limite leur étude et leur classification (Adlaf *et al.* 2016). Ce manque de marqueurs pose tout de même la question d'un potentiel rôle commun à tous les astrocytes et notamment, tous les astrocytes sont-ils capables de former de nouvelles cellules ? Il semble toutefois évident que les cellules de la ZSV sont spécialisées étant donné leur production accrue de cellules chez le rongeur adulte et leur morphologie très caractéristique, proche des cellules de glias radiaires durant le développement.

## **Annexe N : Co-immunoprécipitation des ARN liés à Otx2**

Le protocole utilisé a été adapté à partir de celui de coIP des protéines pour l'identification en spectrométrie de masse (Partie IV, Materials & Methods, p.131). Les PC des ventricules latéraux et du 4<sup>e</sup> ventricule ont été extraits du cerveau de 10 souris sauvages puis traités séparément. L'expérience a été réalisée en triplicat. Les PC sont lysés dans 500 µl de tampon de lyse (20mM Tris pH8, 120mM NaCl, 1% NP40, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5% glycérol, 1X protease/phosphatase inhibitor [Roche]) avec des inhibiteurs de RNase (450U, NEB) avec une aiguille 26G. Après une incubation de 10 minutes sur glace, les tubes sont centrifugés 16 000 g, 4 °C, 12minutes. 25 µl de surnageant sont prélevés et congelés à -20 °C (extrait « input ») et le reste est séparé dans deux tubes low binding (Eppendorf). Au premier tube est ajouté 58,3µL de billes magnétiques couplées à un anticorps anti-Otx2, dans le second tube (contrôle) les billes sont couplées à un anticorps anti-IgG (30mg/ml de billes, 9,5 µg d'Ac/mg de

billes. Anti-Otx2 [ab21990, Abcam]; anti-IgG antibody [ab27478, Abcam]; Dynabeads Antibody Coupling Kit Life Tech). Après une incubation sur la nuit (4 °C sur une roue à 18rpm) les billes magnétiques sont séparées et le surnageant (extrait « unbound ») est congelé. Les billes sont lavées 5 fois avec du tampon de lyse contenant des inhibiteurs de RNase (40U/ml) et resuspendues avec 300µl de ce même tampon. 30 µl sont prélevés (extrait « IP ») et congelés. Au reste des billes est ajouté 1,8 µl de protéinase K (20mg/ml NEB) et 1,4 µl de SDS 20%. Après 30 minutes d'incubation à 37 °C avec rotation, les échantillons sont soumis à une extraction Trizol/Chloroforme afin d'extraire les ARN (kit RNesay Minikit et Min Elute, Qiagen). 900 µl de Trizol sont ajoutés et les tubes sont placés dans un Tissue Lyzer pour 4 minutes à 20 Hz puis incubés 5 minutes à température ambiante. Après l'ajout de 220 µl de chloroforme, les tubes sont vortexés 30 secondes, incubés 2 minutes et centrifugés 15 minutes à 4 °C 12 000 g. A la phase aqueuse récupérée, 1 volume d'éthanol 70% sont additionnés et après vortex le mélange est mis sur une colonne RNeasy Mini Spin Column et centrifugé (8 000 g 15 secondes). Les petits ARN sont passés à travers la colonne et 0,65 volume d'éthanol 100% sont ajoutés au flow-through. Après vortex, le mélange est mis sur une colonne Min Elute, centrifugé, et la membrane contenant les petits ARN est ensuite lavée avec des étapes de divers tampon et centrifugation : 700 µl de RWT, 500 µl de RPE, 500 µl d'éthanol 80%. Après séchage de la membrane, les petits ARN sont élués en deux fois avec 14 µl d'eau. Les ARN de plus de 200pb (long ARN) sont restés sur la membrane de la première colonne qui est lavée avec 350 µl de tampon RW1 et centrifugée. Une étape de digestion de l'ADN est réalisée (15 minutes de DNase I, Qiagen) et la membrane est lavée par ces divers tampons/centrifugation : 350 µl RW1, 500 µl RPE deux fois. Les ARN sont élués en deux fois avec 14 µl d'eau. Tous les échantillons d'ARN sont stockés à -80 °C en attendant d'être analysés.

Nous avons déjà vérifié que la purification d'Otx2 était réussie, sans contamination dans les échantillons contrôle (Figure 47).



### Figure 47 : Contrôle de la co-immunoprécipitation des ARN

Les extraits récupérés au cours de l'expérience ont été déposés sur gel puis des western blot anti-Otx2 ont permis de révéler la réussite de l'immunoprécipitation d'Otx2. (A) Exemple de western blot obtenu. Otx2 est juste au-dessus de 38 kDa. Les autres bandes correspondent aux anticorps utilisés pour la coIP qui se sont détachés des billes. (B) La quantification de l'intensité des bandes correspondantes à Otx2 montre que la majeure partie d'Otx2 est immunoprécipitée par l'anticorps anti-Otx2 alors que dans les contrôles la plus grande partie d'Otx2 est obtenue dans l'extrait « unbound ». (C) L'enrichissement d'Otx2 en comparaison de la coIP contrôle montre un bon enrichissement, bien que variable entre échantillons.

## **VIII- Références bibliographiques**



- Acampora, D. *et al.*, 2001. Otx genes in brain morphogenesis. *Progress in neurobiology*, 64(1), pp.69–95.
- Acampora, D. *et al.*, 2009. Selective inactivation of Otx2 mRNA isoforms reveals isoform-specific requirement for visceral endoderm anteriorization and head morphogenesis and highlights cell diversity in the visceral endoderm. *Mechanisms of development*, 126(10), pp.882–897.
- Acampora, D. *et al.*, 2013. Otx2 is an intrinsic determinant of the embryonic stem cell state and is required for transition to a stable epiblast stem cell condition. *Development*, 140(1), pp.43–55.
- Adlaf, E.W. *et al.*, 2016. Discerning Neurogenic vs. Non-Neurogenic Postnatal Lateral Ventricular Astrocytes via Activity-Dependent Input. *Frontiers in neuroscience*, 10.
- Alonso, M. *et al.*, 2012. Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory : Nature Neuroscience : Nature Publishing Group. *Nature neuroscience*, 15(6), pp.897–904.
- Alvarez-Buylla, A. & Garcia-Verdugo, J.M., 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience*, 22(3), pp.629–634.
- Aspelund, A. *et al.*, 2015. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *The Journal of experimental medicine*, 212(7), pp.991–999.
- Bai, R.-Y. *et al.*, 2012. OTX2 represses myogenic and neuronal differentiation in medulloblastoma cells. *Cancer research*, 72(22), pp.5988–6001.
- Bayraktar, O.A. *et al.*, 2015. Astrocyte development and heterogeneity. *Col Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), p.a020362.
- Beby, F. & Lamonerie, T., 2013. The homeobox gene Otx2 in development and disease. *Experimental eye research*, 111, pp.9–16.
- Bedussi, B. *et al.*, 2016. Clearance from the mouse brain by convection of interstitial fluid towards the ventricular system. *Fluids and barriers of the CNS*, 12(1), pp.1–13.
- Belvindrah, R. *et al.*, 2007. Beta1 integrins control the formation of cell chains in the adult rostral migratory stream. *The Journal of neuroscience*, 27(10), pp.2704–2717.
- Benner, E.J. *et al.*, 2013. Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature*, 497(7449), pp.369–373.
- Bergmann, O. *et al.*, 2012. The Age of Olfactory Bulb Neurons in Humans. *Neuron*, 74(4), pp.634–639.
- Bernard, C. *et al.*, 2014. Graded Otx2 activities demonstrate dose-sensitive eye and retina phenotypes. *Human molecular genetics*, 23(7), pp.1742–1753.



## Références bibliographiques

- Bernard, C. *et al.*, 2016. A Mouse Model for Conditional Secretion of Specific Single-Chain Antibodies Provides Genetic Evidence for Regulation of Cortical Plasticity by a Non-cell Autonomous Homeoprotein Transcription Factor. *PLoS genetics*, 12(5), p.e1006035.
- Bernard, C. & Prochiantz, A., 2016. Otx2-PNN Interaction to Regulate Cortical Plasticity. *Neural plasticity*, 2016, p.7931693.
- Beurdeley, M. *et al.*, 2012. Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *The Journal of neuroscience*, 32(27), pp.9429–9437.
- Biebl, M. *et al.*, 2000. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neuroscience letters*, 291(1), pp.17–20.
- Bill, B.R. & Korzh, V., 2014. Choroid plexus in developmental and evolutionary perspective. *Frontiers in neuroscience*, 8, p.363.
- Bjornsson, C.S. *et al.*, 2015. It takes a village: constructing the neurogenic niche. *Developmental Cell*, 32(4), pp.435–446.
- Blaudin de Thé, F.-X. *et al.*, 2016. Neuroprotective Transcription Factors in Animal Models of Parkinson Disease. *Neural plasticity*, 2016, p.6097107.
- Bolteus, A.J. *et al.*, 2005. Assays for measuring extracellular GABA levels and cell migration rate in acute slices. *Brain Research Protocols*, 14(2), pp.126–134.
- Boncinelli, E. & Morgan, R., 2001. Downstream of Otx2, or how to get a head. *Trends in genetics : TIG*, 17(11), pp.633–636.
- Boon, K. *et al.*, 2005. Genomic amplification of orthodenticle homologue 2 in medulloblastomas. *Cancer research*, 65(3), pp.703–707.
- Borlongan, C.V. *et al.*, 2004. CNS grafts of rat choroid plexus protect against cerebral ischemia in adult rats. *Neuroreport*, 15(10), pp.1543–1547.
- Bovolenta, P. *et al.*, 1997. Implication of OTX2 in pigment epithelium determination and neural retina differentiation. *The Journal of neuroscience*, 17(11), pp.4243–4252.
- Boyl, P.P., Signore, M., Acampora, D., *et al.*, 2001. Forebrain and midbrain development requires epiblast-restricted Otx2 translational control mediated by its 3' UTR. *Development*, 128(15), pp.2989–3000.
- Boyl, P.P., Signore, M., Annino, A., *et al.*, 2001. Otx genes in the development and evolution of the vertebrate brain. *International journal of developmental neuroscience*, 19(4), pp.353–363.
- Brinker, T. *et al.*, 2014. A new look at cerebrospinal fluid circulation. *Fluids and barriers of the CNS*, 11, p.10.

- Brunet, I. *et al.*, 2005. The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature*, 438(7064), pp.94–98.
- Brunet, I. *et al.*, 2007. The topological role of homeoproteins in the developing central nervous system. *Trends in Neurosciences*, 30(6), pp.260–267.
- Bueno, D. *et al.*, 2014. Embryonic blood-cerebrospinal fluid barrier formation and function. *Frontiers in neuroscience*, 8.
- Bueno, D. & Garcia-Fernández, J., 2016. Evolutionary development of embryonic cerebrospinal fluid composition and regulation: an open research field with implications for brain development and function. *Fluids and barriers of the CNS*, 13(1), p.306.
- Capilla-Gonzalez, V. *et al.*, 2013. The generation of oligodendroglial cells is preserved in the rostral migratory stream during aging. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, p.147.
- Carrithers, M.D. *et al.*, 2002. Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology*, 129(1-2), pp.51–57.
- Cavanagh, M.E. *et al.*, 1983. Comparison of proteins in CSF of lateral and IVth ventricles during early development of fetal sheep. *Brain research*, 313(2), pp.159–167.
- Chojnacki, A.K. *et al.*, 2009. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nature Review Neurosciences*, 10(2), pp.153–63.
- Codega, P. *et al.*, 2014. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron*, 82(3), pp.545–559.
- Conover, J.C. & Shook, B.A., 2011. Aging of the subventricular zone neural stem cell niche. *Aging and disease*, 2(1), pp.49–63.
- Courtois, V. *et al.*, 2003. New Otx2 mRNA isoforms expressed in the mouse brain. *Journal of neurochemistry*, 84(4), pp.840–853.
- Damkier, H.H. *et al.*, 2013. Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiological Reviews*, 93(4), pp.1847–1892.
- Darko Orešković, M.K., 2014. A new look at cerebrospinal fluid movement. *Fluids and barriers of the CNS*, 11, p.16.
- Daynac, M. *et al.*, 2016. Age-related neurogenesis decline in the subventricular zone is associated with specific cell cycle regulation changes in activated neural stem cells. *Scientific reports*, 6, p.21505.
- de Wit, J. & Verhaagen, J., 2007. Proteoglycans as modulators of axon guidance cue function. *Advances in experimental medicine and biology*, 600, pp.73–89.

## Références bibliographiques

- Despras, G. *et al.*, 2013. Toward libraries of biotinylated chondroitin sulfate analogues: from synthesis to in vivo studies. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 19(2), pp.531–540.
- Di Lullo, E. *et al.*, 2011. Paracrine Pax6 activity regulates oligodendrocyte precursor cell migration in the chick embryonic neural tube. *Development*, 138(22), pp.4991–5001.
- Dietrich, J. *et al.*, 2008. Mechanisms of Disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. *Nature clinical practice. Oncology*, 5(7), pp.393–404.
- Dityatev, A. *et al.*, 2010. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends in Neurosciences*, 33(11), pp.503–512.
- Doetsch, F. & Alvarez-Buylla, A., 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(25), pp.14895–14900.
- Doetsch, F. *et al.*, 1997. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience*, 17(13), pp.5046–5061.
- Doetsch, F. *et al.*, 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), pp.703–716.
- Doetsch, F. *et al.*, 2002. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron*, 36(6), pp.1021–1034.
- Douet, V. *et al.*, 2013. Fractone-heparan sulphates mediate FGF-2 stimulation of cell proliferation in the adult subventricular zone. *Cell Proliferation*, 46(2), pp.137–145.
- Dreha-Kulaczewski, S. *et al.*, 2015. Inspiration is the major regulator of human CSF flow. *The Journal of neuroscience*, 35(6), pp.2485–2491.
- Dubnau, J. & Struhl, G., 1996. RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature*, 379(6567), pp.694–699.
- Emerich, D.F. *et al.*, 2005. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. *BioEssays*, 27(3), pp.262–274.
- Enwere, E. *et al.*, 2004. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. *The Journal of neuroscience*, 24(38), pp.8354–8365.
- Eriksson, P.S. *et al.*, 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11), pp.1313–1317.
- Ernst, A. *et al.*, 2014. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156(5), pp.1072–1083.
- Faissner, A. & Reinhard, J., 2015. The extracellular matrix compartment of neural

- stem and glial progenitor cells. *Glia*, 63(8), pp.1330–1349.
- Fame, R.M. *et al.*, 2016. Directional cerebrospinal fluid movement between brain ventricles in larval zebrafish. *Fluids and barriers of the CNS*, 13(1), p.1.
- Fant, B. *et al.*, 2015. Comprehensive interactome of Otx2 in the adult mouse neural retina. *Genesis*, 53(11), pp.685–694.
- Fiorelli, R. *et al.*, 2015. Adding a spatial dimension to postnatal ventricular-subventricular zone neurogenesis. *Development*, 142(12), pp.2109–2120.
- Fossat, N. *et al.*, 2006. Temporal and spatial delineation of mouse Otx2 functions by conditional self-knockout. *EMBO reports*, 7(8), pp.824–830.
- Fuentealba, L.C. *et al.*, 2015. Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell*, 161(7), pp.1644–1655.
- Giblin, S.P. & Midwood, K.S., 2015. Tenascin-C: Form versus function. *Cell adhesion & migration*, 9(1-2), pp.48–82.
- Girard, F. *et al.*, 2014. Thrombospondin 4 deficiency in mouse impairs neuronal migration in the early postnatal and adult brain. *Molecular and cellular neurosciences*, 61, pp.176–186.
- Gould, E., 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature reviews. Neuroscience*, 8(6), pp.481–488.
- Götz, M. *et al.*, 2016. Neurogenesis in the Developing and Adult Brain-Similarities and Key Differences. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(7).
- Gritti, A. *et al.*, 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *The Journal of neuroscience*, 22(2), pp.437–445.
- Hack, I. *et al.*, 2002. Reelin is a detachment signal in tangential chain-migration during postnatal neurogenesis. *Nature neuroscience*, 5(10), pp.939–945.
- Hayamizu, T.F. *et al.*, 2001. FGF-2 immunoreactivity in adult rat ependyma and choroid plexus: responses to global forebrain ischemia and intraventricular FGF-2. *Neurological research*, 23(4), pp.353–358.
- Hladky, S.B. & Barrand, M.A., 2014. Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence. *Fluids and barriers of the CNS*, 11(1), p.26.
- Hoch, R.V. *et al.*, 2015. OTX2 Transcription Factor Controls Regional Patterning within the Medial Ganglionic Eminence and Regional Identity of the Septum. *Cell reports*, 12(3), pp.482–494.
- Holst, von, A. *et al.*, 2007. Neural Stem/Progenitor Cells Express 20 Tenascin C Isoforms That Are Differentially Regulated by Pax6. *The Journal of biological chemistry*, 282(12), pp.9172–9181.

## Références bibliographiques

- Hu, H., 1999. Chemorepulsion of neuronal migration by Slit2 in the developing mammalian forebrain. *Neuron*, 23(4), pp.703–711.
- Huang, X. *et al.*, 2009. Sonic hedgehog signaling regulates a novel epithelial progenitor domain of the hindbrain choroid plexus. *Development*, 136(15), pp.2535–2543.
- Huang, X. *et al.*, 2010. Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), pp.8422–8427.
- Ilf, J.J. *et al.*, 2012. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Science translational medicine*, 4(147), p.147ra111.
- Ilf, J.J. *et al.*, 2013. Cerebral arterial pulsation drives paravascular CSF-interstitial fluid exchange in the murine brain. *The Journal of neuroscience*, 33(46), pp.18190–18199.
- Ilf, J.J. *et al.*, 2015. Implications of the discovery of brain lymphatic pathways. *The Lancet. Neurology*, 14(10), pp.977–979.
- Jankovski, A. & Sotelo, C., 1996. Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *The Journal of Comparative Neurology*, 371(3), pp.376–396.
- Joester, A. & Faissner, A., 1999. Evidence for combinatorial variability of tenascin-C isoforms and developmental regulation in the mouse central nervous system. *The Journal of biological chemistry*, 274(24), pp.17144–17151.
- Johanson, C. *et al.*, 2011. The Distributional Nexus of Choroid Plexus to Cerebrospinal Fluid, Ependyma and Brain: Toxicologic/Pathologic Phenomena, Periventricular Destabilization, and Lesion Spread. *Toxicologic Pathology*, 39(1), pp.186–212.
- Johansson, P.A. *et al.*, 2013. The transcription factor Otx2 regulates choroid plexus development and function. *Development*, 140(5), pp.1055–1066.
- Joliet, A. *et al.*, 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), pp.1864–1868.
- Joyner, A.L. *et al.*, 1999. A role for Gbx2: in repression of Otx2: and positioning the mid/hindbrain organizer. *Nature*, 401(6749), pp.161–164.
- Kaneko, N. *et al.*, 2010. New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron*, 67(2), pp.213–223.

- Kasatkin, V. *et al.*, 2008. Morphogenetic Gradients and the Stability of Boundaries Between Neighboring Morphogenetic Regions. *Bulletin of mathematical biology*, 70(1), pp.156–178.
- Katsimpardi, L. *et al.*, 2014. Vascular and Neurogenic Rejuvenation of the Aging Mouse Brain by Young Systemic Factors. *Science*, 344(6184), pp.630–634.
- Kaur, C. *et al.*, 2016. The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 75(3), pp.198–213.
- Kazanis, I. *et al.*, 2007. The adult mouse subependymal zone regenerates efficiently in the absence of tenascin-C. *The Journal of neuroscience*, 27(51), pp.13991–13996.
- Kerever, A. *et al.*, 2007. Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem cells*, 25(9), pp.2146–2157.
- Kim, N. *et al.*, 2014. Regulation of retinal axon growth by secreted Vax1 homeodomain protein. *eLife*, 3, p.e02671.
- Kokovay, E. *et al.*, 2012. VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell stem cell*, 11(2), pp.220–230.
- Konefal, S. *et al.*, 2013. The adaptive significance of adult neurogenesis: an integrative approach. *Frontiers in neuroanatomy*, 7, p.21.
- Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A., 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, 32, pp.149–184.
- Kuro-o, M. *et al.*, 1997. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390(6655), pp.45–51.
- Kurosu, H. *et al.*, 2005. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*, 309(5742), pp.1829–1833.
- Larsen, K.B. *et al.*, 2010. Expression of the homeobox genes OTX2 and OTX1 in the early developing human brain. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 58(7), pp.669–678.
- lehtinen, M.K. & Walsh, C.A., 2011. Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, pp.653–679.
- Lepousez, G. *et al.*, 2013. The impact of adult neurogenesis on olfactory bulb circuits and computations. *Annual review of physiology*, 75, pp.339–363.
- Lesaffre, B. *et al.*, 2007. Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural development*, 2, p.2.
- Liddelow, S.A., 2011. Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint. *Fluids and barriers of the CNS*, 8(1), p.2.

## Références bibliographiques

- Liddelow, S.A., 2015. Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Frontiers in neuroscience*, 9, p.32.
- Lim, D.A. & Alvarez-Buylla, A., 1999. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(13), pp.7526–7531.
- Lim, D.A. *et al.*, 2000. Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28(3), pp.713–726.
- Liu, Z. *et al.*, 2013. Specific expression pattern of a novel Otx2 splicing variant during neural differentiation. *Gene*, 523(1), pp.33–38.
- Llorens-Bobadilla, E. *et al.*, 2015. Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell*, 17(3), pp.329–40.
- Lochhead, J.J. *et al.*, 2014. Rapid transport within cerebral perivascular spaces underlies widespread tracer distribution in the brain after intranasal administration. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(3), pp.371–381.
- Lois, C. *et al.*, 1996. Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 271(5251), pp.978–981.
- Louveau, A., Harris, T.H. & Kipnis, J., 2015. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends in Immunology*, 36(10), pp.569–577.
- Louveau, A., Smirnov, I., *et al.*, 2015. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 523(7560), pp.337–341.
- Lun, M.P., Johnson, M.B., *et al.*, 2015. Spatially Heterogeneous Choroid Plexus Transcriptomes Encode Positional Identity and Contribute to Regional CSF Production. *The Journal of neuroscience*, 35(12), pp.4903–4916.
- Lun, M.P., Monuki, E.S. & lehtinen, M.K., 2015. Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nature Publishing Group*, 16(8), pp.445–457.
- Luo, J. *et al.*, 2008. Subventricular zone-mediated ependyma repair in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience*, 28(14), pp.3804–3813.
- Ma, D.K. *et al.*, 2005. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Current opinion in neurobiology*, 15(5), pp.514–520.
- Mallamaci, A. *et al.*, 1996. OTX2 homeoprotein in the developing central nervous system and migratory cells of the olfactory area. *Mechanisms of development*, 58(1-2), pp.165–178.
- Mamber, C. *et al.*, 2010. In vivo targeting of subventricular zone astrocytes. *Progress in neurobiology*, 92(1), pp.19–32.

- Marques, S. *et al.*, 2016. Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science*, 352(6291), pp.1326–1329.
- Martín, C. *et al.*, 2006. FGF2 plays a key role in embryonic cerebrospinal fluid trophic properties over chick embryo neuroepithelial stem cells. *Developmental biology*, 297(2), pp.402–416.
- Mason, H.A. *et al.*, 2001. Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *The Journal of neuroscience*, 21(19), pp.7654–7663.
- Matsuo, I. *et al.*, 1995. Mouse Otx2 functions in the formation and patterning of rostral head. *Genes & development*, 9(21), pp.2646–2658.
- McGinnis, W. & Krumlauf, R., 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, 68(2), pp.283–302.
- Meeker, RB *et al.*, 2012. Cell trafficking through the choroid plexus. *Cell adhesion & migration*, 6(5), p.390.
- Menn, B. *et al.*, 2006. Origin of Oligodendrocytes in the Subventricular Zone of the Adult Brain. *The Journal of neuroscience*, 26(30), pp.7907–7918.
- Mercier, F. *et al.*, 2002. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *The Journal of Comparative Neurology*, 451(2), pp.170–188.
- Mercier, F. & Douet, V., 2014. Bone morphogenetic protein-4 inhibits adult neurogenesis and is regulated by fractone-associated heparan sulfates in the subventricular zone. *Journal of chemical neuroanatomy*, 57-58, pp.54–61.
- Merkle, F.T. *et al.*, 2007. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 317(5836), pp.381–384.
- Ming, G.-L. & Song, H., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 70(4), pp.687–702.
- Mirzadeh, Z. *et al.*, 2008. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell stem cell*, 3(3), pp.265–278.
- Morrison, S.L., 2007. Two heads are better than one. *Nature biotechnology*, 25(11), pp.1233–1234.
- Mortazavi, M.M. *et al.*, 2014. The choroid plexus: a comprehensive review of its history, anatomy, function, histology, embryology, and surgical considerations. *Child's nervous system*, 30(2), pp.205–214.
- Murakami, M., 2012. Signaling Required for Blood Vessel Maintenance: Molecular Basis and Pathological Manifestations. *International Journal of Vascular Medicine*, 2012(6), pp.1–15.



## Références bibliographiques

- Murase, S.-I. *et al.*, 2008. ADAM2 promotes migration of neuroblasts in the rostral migratory stream to the olfactory bulb. *The European journal of neuroscience*, 27(7), pp.1585–1595.
- Nam, H.-S. & Benezra, R., 2009. High levels of Id1 expression define B1 type adult neural stem cells. *Cell stem cell*, 5(5), pp.515–526.
- Nédélec, S. *et al.*, 2004. Emx2 homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), pp.10815–10820.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T. *et al.*, 1998. A potential role for the OTX2 homeoprotein in creating early “highways” for axon extension in the rostral brain. *Development*, 125(21), pp.4273–4282.
- Nguyen-Ba-Charvet, K.T. *et al.*, 2004. Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *The Journal of neuroscience*, 24(6), pp.1497–1506.
- Nielsen, C.M. & Dymecki, S.M., 2010. Sonic hedgehog is required for vascular outgrowth in the hindbrain choroid plexus. *Developmental biology*, 340(2), pp.430–437.
- Niessing, D. *et al.*, 2002. Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and represses translation. *Genes & development*, 16(19), pp.2576–2582.
- Nishida, A. *et al.*, 2003. Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nature neuroscience*, 6(12), pp.1255–1263.
- Ortega, F. *et al.*, 2013. Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit differential responsiveness to Wnt signalling. *Nature Cell Biology*, 15(6), pp.602–13.
- Pardali, E. *et al.*, 2010. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends in Cell Biology*, 20(9), pp.556–567.
- Pardridge, M.W., 1995. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Advanced drug delivery reviews*, 15(1-3), pp.5–36.
- Paredes, M.F., Sorrells SF *et al.*, 2016. Brain size and limits to adult neurogenesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 524(3), pp.646–664.
- Paredes, M.F., James, D., *et al.*, 2016. Extensive migration of young neurons into the infant human frontal lobe. *Science*, 354(6308), pp.81.
- Parras, C.M. *et al.*, 2004. Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *The EMBO journal*, 23(22), pp.4495–4505.

- Pastrana, E. *et al.*, 2009. Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(15), pp.6387–6392.
- Peretto, P. *et al.*, 2005. Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 487(4), pp.407–427.
- Pignatelli A, & Belluzzi O., 2010. Neurogenesis in the Adult Olfactory Bulb. In: Menini A, editor. *The Neurobiology of Olfaction*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Chapter 11. *Frontiers in neurosciences*.
- Platel, J.C. & Bordey, A., 2016. The multifaceted subventricular zone astrocyte: From a metabolic and pro-neurogenic role to acting as a neural stem cell. *Neuroscience*, 323, pp.20–28.
- Pollay, M., 2010. The function and structure of the cerebrospinal fluid outflow system. *Cerebrospinal fluid research*, 7, p.9.
- Ponti, G. *et al.*, 2013. Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(11), pp.E1045–54.
- Prochiantz, A. & Di Nardo, A.A., 2015. Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. *Neuron*, 85(5), pp.911–925.
- Quiñinao, C. *et al.*, 2015. Local homeoprotein diffusion can stabilize boundaries generated by graded positional cues. *Development*, 142(10), pp.1860–1868.
- Rakic, P., 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nature Publishing Group*, 10(10), pp.724–735.
- Rath, M.F. *et al.*, 2006. Expression of the Otx2 homeobox gene in the developing mammalian brain: embryonic and adult expression in the pineal gland. *Journal of neurochemistry*, 97(2), pp.556–566.
- Reichert, H. & Simeone, A., 1999. Conserved usage of gap and homeotic genes in patterning the CNS. *Current opinion in neurobiology*, 9(5), pp.589–595.
- Rivera-Pomar, R. *et al.*, 1996. RNA binding and translational suppression by bicoid. *Nature*, 379(6567), pp.746–749.
- Rödel, C.J *et al.*, 2013. MicroRNAs act as cofactors in bicoid-mediated translational repression. *Current biology : CB*, 23(16), pp.1579–1584.
- Sagan, S. *et al.*, 2013. Homeoproteins and homeoprotein-derived peptides: going in and out. *Current pharmaceutical design*, 19(16), pp.2851–2862.
- Saghatelian, A. *et al.*, 2004. Tenascin-R mediates activity-dependent recruitment of neuroblasts in the adult mouse forebrain. *Nature neuroscience*, 7(4), pp.347–356.

## Références bibliographiques

- Saito, S. *et al.*, 2014. Differential expression of the alternatively spliced forms of prosaposin mRNAs in rat choroid plexus. *Cell and tissue research*, 356(1), pp.231–242.
- Sakamoto, M. *et al.*, 2014. The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits. *Frontiers in neuroscience*, 8, p.121.
- Sanai, N. *et al.*, 2007. Comment on « Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension ». *Science*, 318(5849), pp.393–author reply 393.
- Sanai, N. *et al.*, 2011. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*, 478(7369), pp.382–386.
- Sandrof, M.A. *et al.* 2016. Primary Choroid Plexus Tissue for Use in Cellular Therapy. *Methods in Molecular Biology*, 1479, part IV, pp.237-249.
- Sawada, M. & Sawamoto, K., 2013. Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *The Keio Journal of Medicine*, 62(1), pp.13–28.
- Sawamoto, K. *et al.*, 2006. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*, 311(5761), pp.629–632.
- Scholze, A., *et al.*, 1996. Glial cell interactions with tenascin-C: adhesion and repulsion to different tenascin-C domains is cell type related. *International journal of developmental neuroscience*, 14(3), pp.315–329.
- Schwerk, C. *et al.*, 2015. The choroid plexus-a multi-role player during infectious diseases of the CNS. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, p.80.
- Shen, Q. *et al.*, 2008. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell stem cell*, 3(3), pp.289–300.
- Silva-Vargas, V. *et al.*, 2013. Adult neural stem cells and their niche: a dynamic duo during homeostasis, regeneration, and aging. *Current opinion in neurobiology*, 23(6), pp.935–942.
- Silva-Vargas, V. *et al.*, 2016. Age-Dependent Niche Signals from the Choroid Plexus Regulate Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell*, in Press.
- Simon, M.J. & Iliff, J.J., 2016. Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), pp.442–451.
- Skinner, S.J.M. *et al.*, 2006. Choroid plexus transplants in the treatment of brain diseases. *Xenotransplantation*, 13(4), pp.284–288.
- Snapyan, M. *et al.*, 2009. Vasculature Guides Migrating Neuronal Precursors in the Adult Mammalian Forebrain via Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling. *The Journal of neuroscience*, 29(13), pp.4172–4188.

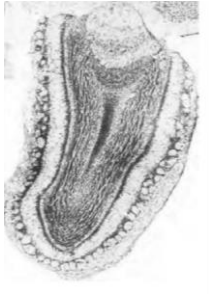
- Sohn, J. *et al.*, 2015. The subventricular zone continues to generate corpus callosum and rostral migratory stream astroglia in normal adult mice. *Jneurosci.org*, 35(9), pp.3756–3763.
- Song, H., Stevens, C.F. & Gage, F.H., 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417(6884), pp.39–44.
- Song, H.-J., Stevens, C.F. & Gage, F.H., 2002. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature neuroscience*, 5(5), pp.438–445.
- Spalding, K.L. *et al.*, 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell*, 153(6), pp.1219–1227.
- Spatazza, J., Di Lullo, E., *et al.*, 2013. Homeoprotein signaling in development, health, and disease: a shaking of dogmas offers challenges and promises from bench to bed. *Pharmacological reviews*, 65(1), pp.90–104.
- Spatazza, J., Lee, H.H.C., *et al.*, 2013. Choroid-plexus-derived otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity. *Cell reports*, 3(6), pp.1815–1823.
- Stettler, O. *et al.*, 2012. Engrailed homeoprotein recruits the adenosine A1 receptor to potentiate ephrin A5 function in retinal growth cones. *Development*, 139(1), pp.215–224.
- Sugiyama, S. *et al.*, 2008. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell*, 134(3), pp.508–520.
- Swetloff, A. & Ferretti, P., 2005. Changes in E2F5 intracellular localization in mouse and human choroid plexus epithelium with development. *The International journal of developmental biology*, 49(7), pp.859–865.
- Tavazoie, M. *et al.*, 2008. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell stem cell*, 3(3), pp.279–288.
- Theocharidis, U. *et al.*, 2014. Regulation of the neural stem cell compartment by extracellular matrix constituents. *Progress in brain research*, 214, pp.3–28.
- Thomas, L.B. *et al.*, 1996. Young neurons from the adult subependymal zone proliferate and migrate along an astrocyte, extracellular matrix-rich pathway. *Glia*, 17(1), pp.1–14.
- Thouvenot, E. *et al.*, 2006. The proteomic analysis of mouse choroid plexus secretome reveals a high protein secretion capacity of choroidal epithelial cells. *PROTEOMICS*, 6(22), pp.5941–5952.
- Tong, C.K. & Alvarez-Buylla, A., 2014. SnapShot: Adult Neurogenesis in the V-SVZ. *Neuron*, 81(1), pp.220–220.e1.
- Tong, C.K. *et al.*, 2015. A Dorsal SHH-Dependent Domain in the V-SVZ Produces Large Numbers of Oligodendroglial Lineage Cells in the Postnatal Brain. *Stem Cell Reports*, 5(4), pp.461–470.

## Références bibliographiques

- Tong, C.K. *et al.*, 2014. Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell stem cell*, 14(4), pp.500–511.
- Topisirovic, I. & Borden, K.L.B., 2005. Homeodomain proteins and eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E): an unexpected relationship. *Histology and histopathology*, 20(4), pp.1275–1284.
- Tropepe, V. *et al.*, 1997. Transforming growth factor- $\alpha$  null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *The Journal of neuroscience*, 17(20), pp.7850–7859.
- Urbán, N. & Guillemot, F., 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, p.396.
- Wachs, F.-P. *et al.*, 2006. Transforming growth factor- $\beta$ 1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 65(4), pp.358–370.
- Wang, C. *et al.*, 2011. Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell research*, 21(11), pp.1534–1550.
- Wang, C. *et al.*, 2014. Human and monkey striatal interneurons are derived from the medial ganglionic eminence but not from the adult subventricular zone. *The Journal of neuroscience*, 34(33), pp.10906–10923.
- Wassarman, K.M. *et al.*, 1997. Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function. *Development*, 124(15), pp.2923–2934.
- Whitman, M.C. & Greer, C.A., 2009. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Progress in neurobiology*, 89(2), pp.162–175.
- Whitman, M.C. *et al.*, 2009. Blood Vessels Form a Migratory Scaffold in the Rostral Migratory Stream. *The Journal of Comparative Neurology*, 516(2), pp.94–104.
- Wichterle, H. *et al.*, 1997. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*, 18(5), pp.779–791.
- Wiese, S. *et al.*, 2012. Astrocytes as a source for extracellular matrix molecules and cytokines. *Frontiers in pharmacology*, 3, p.120.
- Winner, B. *et al.*, 2002. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *The European journal of neuroscience*, 16(9), pp.1681–1689.
- Wizenmann, A. *et al.*, 2009. Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron*, 64(3), pp.355–366.
- Wojcik-Stanaszek, L. *et al.*, 2011. Regulation of neurogenesis by extracellular matrix and integrins. *Acta neurobiologiae experimentalis*, 71(1), pp.103–112.

- Wolburg, H. & Paulus, W., 2010. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), pp.75–88.
- Xie, L. *et al.*, 2013. Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. *Science*, 342(6156), pp.373–377.
- Young, K.M. *et al.*, 2013. Oligodendrocyte Dynamics in the Healthy Adult CNS: Evidence for Myelin Remodeling. *Neuron*, 77(5), pp.873–885.
- Young, K.M. *et al.*, 2007. p75 neurotrophin receptor expression defines a population of BDNF-responsive neurogenic precursor cells. *The Journal of neuroscience*, 27(19), pp.5146–55.
- Yu, Z. *et al.*, 2005. Contextual interactions determine whether the Drosophila homeodomain protein, Vnd, acts as a repressor or activator. *Nucleic Acids Research*, 33(1), pp.1–12.
- Zakin, L. *et al.*, 2000. Gene expression profiles in normal and Otx2<sup>-/-</sup> early gastrulating mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), pp.14388–14393.
- Zappaterra, M.D. *et al.*, 2007. A comparative proteomic analysis of human and rat embryonic cerebrospinal fluid. *Journal of proteome research*, 6(9), pp.3537–3548.
- Zappaterra, M.W. & lehtinen, M.K., 2012. The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cellular and molecular life sciences*, 69(17), pp.2863–2878.
- Ziegler, A.N. *et al.*, 2012. IGF-II promotes stemness of neural restricted precursors. *Stem cells*, 30(6), pp.1265–1276.
- Ziv, Y. *et al.*, 2006. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nature neuroscience*, 9(2), pp.268–275.
- Zlokovic, B.V., 2011. Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nature Publishing Group*, 12(12), pp.723–738.

(A)

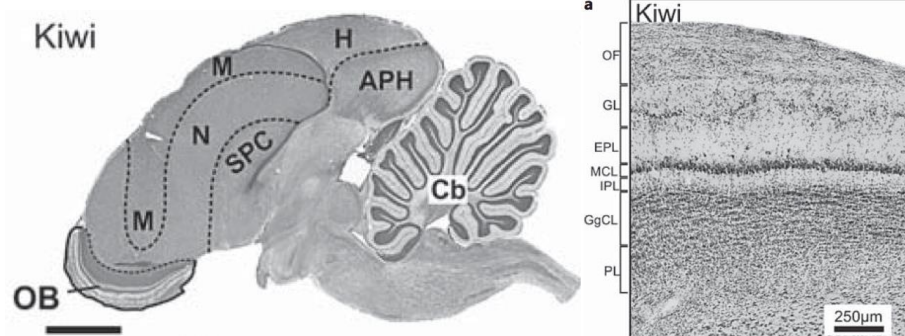


Coppola, D.M., 2012. Studies of olfactory system neural plasticity: the contribution of the unilateral naris occlusion technique. *Neural plasticity*, 2012, p.351752.

(B)



(C)



Corfield, J.R. *et al.*, 2014. Anatomical specializations for enhanced olfactory sensitivity in kiwi, *Apteryx mantelli*. *Brain, behavior and evolution*, 84(3), pp.214–226.





La neurogenèse adulte permet la formation de nouveaux neurones dans les bulbes olfactifs de la souris à partir de cellules souches neurales situées dans la zone sous-ventriculaire (ZSV). La prolifération et la migration des précurseurs générés par les cellules souches a lieu dans une niche neurogénique contenant des cellules de support et une matrice extracellulaire (MEC) qui peuvent contrôler ces processus. Cette niche est aussi régulée par des facteurs contenus dans le liquide cébrospinal (LCS) qui sont produits par les plexus choroïdes (PC) et qui contrôlent la prolifération et/ou la migration. Le facteur de transcription *Otx2* est une homéoprotéine exprimée par les PC, sécrétée dans le LCS, et internalisée spécifiquement par certaines cellules du parenchyme cérébral. *Otx2* est impliquée dans différentes étapes du développement du cerveau, dont celui des PC, et peut agir de manière non-cellulaire-autonome. Ma thèse vise à comprendre comment *Otx2* régule les fonctions des PC et participe à la neurogenèse adulte.

Grâce à des études génomiques d'un modèle murin knockdown (KD) d'*Otx2* dans les PC adultes, nous avons montré que (i) les PC de différents ventricules présentent des profils d'expression différents (ii) le KD d'*Otx2* modifie l'expression de gènes impliqués dans des fonctions importantes des PC (iii) la dérégulation de certains gènes après KD est spécifique d'un type de PC. Une étude protéomique suggère (iv) qu'*Otx2* pourrait être impliquée à d'autres niveaux que la régulation transcriptionnelle.

L'étude de la neurogenèse adulte dans des modèles murins KD d'*Otx2* pour réduire l'activité non-cellulaire ou cellulaire autonome d'*Otx2* dans les PC adultes nous a permis de montrer que (i) l'expression d'*Otx2* dans les PC régule la neurogenèse adulte (ii) *Otx2* transfère dans les astrocytes de la ZSV (iii) le transfert d'*Otx2* est suffisant pour réguler la neurogenèse (iv) le KD d'*Otx2* dans les PC modifie l'expression de protéines de la MEC sécrétées par les astrocytes.