



Étude de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer à partir de modèles in vivo et de neurones humains reprogrammés

Camille Thiberge

► To cite this version:

Camille Thiberge. Étude de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer à partir de modèles in vivo et de neurones humains reprogrammés. Neurobiologie. Sorbonne Université, 2023. Français. ⟨NNT: 2023SORUS215⟩. ⟨tel-04206098⟩

HAL Id: tel-04206098

<https://theses.hal.science/tel-04206098v1>

Submitted on 13 Sep 2023

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.



HAL Authorization

SORBONNE UNIVERSITE

École doctorale Cerveau, Cognition et Comportement (ED3C)

Équipe Neurobiologie Intégrative des Systèmes Cholinergiques

Étude de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer à partir de modèles in vivo et de neurones humains reprogrammés.

Présenté par Camille Thiberge

THESE DE DOCTORAT DE NEUROSCIENCES

Dirigée par le Dr. Isabelle Cloëz-Tayarani

Présentée et soutenue publiquement le 30 juin 2023

Devant un jury composé de :

Dr. Cécile Martinat, DR, HDR, i-Stem

Pr. Gilbert Bernier, PU, Université de Montréal

Pr. Olivier Raineteau, DR, HDR, Université de Lyon 1

Dr. Delphine Bohl, CR, HDR, ICM

Dr. Carlos Parras, CR, HDR, ICM

Dr. Uwe Maskos, DR, HDR, Institut Pasteur

Dr. Isabelle Cloëz-Tayarani, CR Expert, HDR, Institut Pasteur

Présidente du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Invité

Directrice de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

À mon grand-père Jean-Pierre,

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est la forme principale de démence et demeure incurable. Elle se présente sous deux formes : la première, majoritaire (>95% des cas) et non héréditaire est dite « sporadique » (MAs). La deuxième est la forme familiale (MAf) et résulte de mutations génétiques. L'étiologie de la MAs restant à ce jour peu connue, la majorité des recherches sont axées sur le développement de modèles mimant la MAf. Récemment, il a été montré que la modulation de l'expression du gène *BMI1* permet de reproduire les caractéristiques de la MAs, in vitro, dans des neurones dérivés de cellules souches embryonnaires (ESC) d'individu sain.

Mon projet de thèse a permis de développer plusieurs méthodologies de xénotransplantation pour mettre en place un modèle MAs basé sur la modulation de l'expression du gène *BMI1*. Ainsi, des cellules pluripotentes induites humaines (hiPSC) ont été dérivées en cellules progénitrices neuronales (hNPC) contrôle (NI), puis infectées par un lentivirus permettant de diminuer (*BMI1*) ou non (SCR) l'expression du gène *BMI1*. Elles ont été ensuite transplantées dans le cerveau de souris adulte pour l'étude in vivo de la MA. Mes travaux ont permis d'établir différentes approches de xénotransplantation des hNPC dérivés d'hiPSC, à la fois chez la souris adulte, et au stade embryonnaire (in utero).

Dans un premier temps la xénotransplantation in utero a permis de suivre l'évolution des hNPC greffées dans les ventricules latéraux (LV) ou dans le cortex préfrontal (PFC) dans un environnement immunocompétent. Les résultats montrent que les NPC lorsque greffées dans les LV migrent dans différentes régions cibles du cerveau. Il a également été observé que l'environnement de l'hôte selon la région greffée chez l'embryon (LV vs. PFC) influence la maturation synaptique, tout en maintenant les caractéristiques globales intrinsèques de développement des neurones humains par rapport aux neurones murins adultes. Les cellules transplantées dans le PFC acquièrent une morphologie plus mature que celles transplantées dans le LV.

Dans un second temps, la technique de transplantation des hNPC chez la souris adulte immunodéficiente a permis d'étudier l'effet de la diminution partielle de l'expression du gène *BMI1* sur neurones humains dérivés d'iPSC en première approche in vivo. Des analyses morphologiques préliminaire des neurones « NI », « SCR » et « *BMI1* » suggèrent une altération de l'architecture du noyau des neurones *BMI1*. Cette étude pourra être élargie au modèle de xénogreffe in utero permettant l'accès à un modèle davantage proche de la physiologie humaine.

Les perspectives de mon travail de thèse comprennent également l'utilisation d'un système d'expression inductible permettant une inactivation *BMI1* ciblée sur divers stades neurodéveloppementaux afin de décrypter au niveau moléculaire et cellulaire les mécanismes précoces de la MAs

Mots clés : Alzheimer, *BMI1*, Xénotransplantation, iPSC, In Utero, Spinogénèse

Abstract

Alzheimer disease (AD) is the main form of dementia and is still incurable. It occurs in 2 forms: the first, the majority (>95% of cases) and non-hereditary, is called “sporadic” (sAD). The second is the familial form (fAD) and results from genetic mutations. As the etiology of sAD remains unclear, most of research is focused on models mimicking the fAD. It has been recently shown that modulating the expression of *BMI1* gene allows to reproduce the sAD hallmark in vitro, in embryonic stem cells derived neurons from healthy control.

My thesis project developed different xenotransplantation methodologies in order to set up a sAD model based on the modulation of BMI1 expression. Therefore, human induced pluripotent stem cells (hiPSC) were derived into control (NI) neural progenitor cells (NPC) and then infected with a lentivirus allowing to decrease (shBMI1) or not (shSCR) the expression of BMI1. These cells were then transplanted into the brain of adult mice to study the sAD in vivo. My work established different xenotransplantation approaches of hiPSC derived NPC, both in adult and at the embryonic stage (in utero).

First, the in utero xenotransplantation allowed us to follow the evolution of NPC grafted either in the lateral ventricles (LV) or in the prefrontal cortex (PFC) in an immunocompetent environment. The results show that NPCs when transplanted into LVs migrate to different regions of the host brain. It has also been observed that the host environment depending on the transplanted region in the embryo (LV vs. PFC) influences synaptic maturation, while maintaining the overall intrinsic developmental characteristics of human neurons compared to adult murine neurons. Cells transplanted into PFC acquire a more mature morphology than those transplanted into LV.

In a second step, the methodology of NPC transplantation into adult immunodeficient mice allowed to study the effect of the downregulation of BMI1 gene expression on hiPSC in a first in vivo approach. Preliminary morphological analyses of "NI", "SCR" and "BMI1" neurons suggest an alteration of the architecture of the nucleus of shBMI1 neurons. This study could be extended to the in utero xenograft model allowing access to a model closer to human physiology.

The perspectives of my work include the use of an inducible system as well, allowing the BMI1 inactivation on various neurodevelopmental stages in order to decipher the early mechanisms of AD at the molecular and cellular level.

Mots clés : Alzheimer, BMI1, Xenotransplantation, iPSC, In Utero, Spinogenesis

Remerciements

Je voudrais remercier tout d'abord les rapporteurs de mon jury pour le temps qu'ils ont passé à relire mon manuscrit, leurs commentaires, pour l'évaluation de mon travail mais aussi pour leur adaptabilité. J'aimerais également exprimer ma gratitude envers mes examinateurs pour avoir accepté mon invitation et pour avoir généreusement partagé leur expertise avec moi.

Je souhaiterais ensuite remercier ma directrice de thèse, le **Dr. Isabelle Cloez-Tayarani** de m'avoir confié ce projet. Isabelle, je te remercie pour ton soutien et ta disponibilité qui, même en période de restriction CoVid, n'a jamais failli. Je te remercie également pour le partage de ton expérience et tes conseils bienveillants, notamment lors des phases rédactionnelles des différentes étapes de ma thèse.

Je tiens également à remercier mon responsable le **Dr. Uwe Maskos** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire depuis mon stage de M2 et d'avoir fait son possible pour nous permettre de travailler dans de bonnes conditions malgré les différents événements rencontrés ces dernières années.

Mes remerciements vont ensuite à **Stéphanie**. Tu es un véritable pilier dans ce labo. Je te suis très reconnaissante de ces heures passées à m'aider sur mes projets, pour tes précieux conseils, pour tes relectures et tes commentaires. Merci pour ta bienveillance, ta disponibilité, ton écoute et ton soutien moral. Ma thèse n'aurait pas été la même sans toi à coup sûr. J'espère que les disparitions de clés du labo te manqueront !

Ces années n'auraient pas été les mêmes sans **Maria**, ma binôme ou conjointe de laboratoire. Je suis extrêmement reconnaissante d'avoir pu partager tous ces moments avec toi. Tu fais ressortir le meilleur de ton entourage et il est certain que ta présence a été essentielle tout au long de ce périple. Je te remercie pour cette amitié hors norme et suis impatiente de connaître la suite de nos aventures.

Un énorme merci à **l'équipe NISC** pour créer cet environnement de travail mais aussi de partage et de rigolades si agréable. **Morgane, Gabi, Chloé**, merci pour votre bienveillance, pour les discussions scientifiques mais pas que... comme nos histoires de chats qui ravissent tant Chloé. Je ne m'étonnerais pas que tu en aies un d'ici quelques années d'ailleurs. Merci aux rayons de soleil sud-américains, **Francisco & Jimena** pour leur jovialité sans pareil. Francisco, tes blagues et tes histoires me manqueront ! Merci également à **Michiel** pour ton implication rigoureuse et enthousiaste dans ces différents projets. Travailler avec toi durant ces quelques mois a été très agréable et je te souhaite le meilleur pour la suite. **Laurène, Cécile** merci à vous également pour votre aide et votre bonne humeur.

On oublie souvent à quel point votre rôle est important dans les labos. Aux Erasmus qui ont partagés notre quotidien ces dernières années, **Paula, Michelle, Fatima, & Martha** merci. Je remercie également **Sylvie** pour son aide apportée aux différentes tâches administratives.

J'aimerais également remercier les anciens membres du laboratoire. À **Fani**, qui m'a donné l'envie d'en savoir plus sur la maladie d'Alzheimer lors de mon stage de M2. Merci pour ton enseignement, ton soutien et tous les bons moments que nous avons passé ensemble. Je te souhaite tout le meilleur pour cette nouvelle position que tu viens d'obtenir ! A **Célia**, merci pour ta bienveillance et ton aide au début de cette thèse en particulier pour tes conseils en culture cellulaire. A **Jérémy** et **Estelle**, merci pour tous ces moments sympathiques, entre autres, autour des délicieux gâteaux de Jérémy, pour votre soutien et votre écoute. Nos potins me manquent !

À **Annousha** et **Astride**, vous avez été de merveilleuses stagiaires. Merci pour votre investissement à des moments qui n'étaient pas évidents et pour votre énergie tellement positive ! Je vous souhaite tout le meilleur pour le reste de votre cursus, en espérant avoir un peu de vos nouvelles.

J'aimerais aussi remercier **Alexandre** et **Aline** du laboratoire de Thomas Bourgeron ainsi que **Hudson** pour leur aide, leur gentillesse et leurs enseignements.

Aux PhD buddies et futurs docteurs **Miruna, Daniela, Enzo, Iago**, et **Stefano** merci également pour nos moments de rire et de frustration autour d'un verre (ou plus !). Merci d'avoir rendu plus doux les moments difficiles.

À tous les membres du département et en particulier **Gabrielle, Marie P, Ben, Fred, Tara, Rhizlane, Nathalie B.** et **Nathalie L.**, qui m'ont accompagné ces 3 ans et 9 mois et avec qui j'ai pu partager des pauses café et des déjeuners, avec qui j'ai discuté et refait le monde, merci pour ces agréables moments en votre compagnie.

J'aimerais également remercier les membres de mon comité le **Dr. Emmanuel Nivet** et le **Dr. Frank Yates** pour leur suivi, leurs discussions scientifiques et leur écoute. Votre bienveillance et vos conseils ont été d'une grande richesse tout le long de ma thèse. Merci.

À la Plateforme UTechS PBI et en particulier à ses membres **Julien Fernandes, Elric Esposito, Lesly Raulin, Audrey Salles** et **Nathalie Aulner** pour leur service, leur disponibilité et les formations qui m'ont permis de découvrir la beauté de la microscopie.

Je remercie également nos collaborateurs de la plateforme UTechS CB **Milena Hasan, Sophie Novault, Valentina Libri** et **Carolina Morae**, de la plateforme Biomics **Marc Monot, Azimidine Habib** et **Laurence Motreff** ainsi que **Sébastien Mella** du Hub de Bioinformatique et Biostatistique pour leur contribution et le partage de leur expertise dans le cadre de mes travaux de thèse. Merci aussi Jean-Yves Tinevez du Hub d'analyse d'Image sans qui, les analyses morphologiques entreprises dans mes deux projets par l'utilisation du logiciel Imaris n'auraient pas été possible. Merci également aux membres de son équipe et en particulier à Stéphane Rigaud pour leurs conseils pour l'analyse d'image

Je remercie ensuite le Doc'Office et son responsable le **Dr. Deshmukh GoPaul**, ma tutrice **Hélène Strick-Marchand** ainsi que l'équipe du Tutorat, et en particulier le **Dr. Karin Eiglemeier** pour leur écoute, leur vigilance et leur motivation à nous donner accès à un excellent cadre de formation.

Merci également à la **Fondation Recherche Alzheimer** qui m'a apporté son soutien moral et financier pour ce projet de thèse. Merci pour avoir également reconduit votre engagement pour ces 9 mois supplémentaires si important.

A mes amis **Maud, Awen, Steven, Anaïs, Solène, Antoine, Max**, et **Nolwenn** à qui j'ai fait subir de longues discussions sur la science, la recherche et la vie en laboratoire. Merci également pour votre positivité et votre soutien. Pour nos soirées (visio pendant le Covid), pour nos discussions animées, nos week-ends, nos vacances qui pendant ces 4 années ont été des bulles de bonheur, merci.

To my friends, **Marie and Nick, Mike, Balázs**, and **Alina**. I would like to thank you all of you for your kindness and for the friendship we have been able to settle. I'm so grateful to have such beautiful persons as you in my life. You'll always find a home in Paris or wherever I may be in the future.

Je remercie également deux équipes de l'Institut Pasteur qui m'ont souvent vu passer. L'équipe du CEPIA **Audrey, Sylvain, Stéphane, Jennifer** et **Hélène** pour avoir suivi par intermédiaire mes folles aventures, pour leur soutien, leur gentillesse et leur compassion. Vous êtes une équipe formidable. Merci également à l'équipe de **Rogério Amino** et en particulier **Pauline**, pour toutes nos discussions scientifiques ou non, pour ton soutien scolaire que tu n'hésitais pas à me donner pendant ta thèse, pour m'avoir remonté le moral, merci.

A toutes les belles personnes que j'ai pu croiser sur le campus et ailleurs qui m'ont inspiré, je vous remercie **Hirac, Christophe, Geneviève, Freddy, Bertrand** et **Stéphanie...**

A ma famille et en particulier à mes parents **Sabine** et **Jean-Michel**, infiniment merci. Si je suis arrivée jusqu'ici c'est aussi grâce à vous. Merci à vous d'avoir toujours été présent quoiqu'il arrive, de

me pousser à toujours donner le meilleur de moi-même. Merci de croire en moi, de me soutenir et de me remotiver dans les moments où j'en ai besoin. Merci pour votre douceur, votre tolérance et votre amour qui m'encourage à vous rendre toujours plus fiers. A mon frère **Matthieu**, merci mille fois également. En tant qu'aînée j'ai toujours eu la pression de te montrer l'exemple et cela m'a poussé à grandir, à me responsabiliser, à être à l'écoute et à être plus tolérante. Finalement une partie du chemin personnel qu'entraîne le doctorat, je l'avais entrepris avec toi. Pour tout ça merci. Merci à **Romane** d'avoir été là dans ces dernières semaines difficiles, cela a beaucoup compté. A ma grand-mère **Chantal**, merci pour ta bienveillance et ta capacité à faire le bien autour de toi. Merci pour m'avoir toujours soutenue et encouragée, pour les petits plats mijotés lorsque j'avais trop de travail pour que nous puissions bien manger.

Un grand merci également à ma belle-famille et en particulier à **Liliane, Joël, Stéphanie** et **Émilie**. Merci pour votre soutien et vos encouragements notamment durant ces dernières années. Cela m'a aussi beaucoup remotivé.

Enfin je termine ces remerciements avec toi **Augustin**. Je te remercie pour ton soutien et ton amour qui ont été si indispensable tout le long de ces années. Merci pour ta bienveillance, pour avoir pris soin de moi, pour n'avoir jamais lâché, pour m'avoir rassuré dans mes moments de doutes, pour Thorin, pour tout en réalité. Cette thèse je te la dédicace également et j'ai hâte de voir ce que l'avenir nous réserve ensemble.

Tables des Abréviations

A

A	Marqueurs amyloïdopathie
Aβ	Amyloïde β
AA	Acides aminés
ACh	Acétylcholine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADNn	Acide désoxyribonucléique nucléaire
AEBP2	Adipocyte enhancer-binding protein 2
AICD	Amyloid intracellular domain
APLP1	APP-like protein 1
APLP2	APP-like protein 2
APOE	Apolipoprotéine E
APP	Amyloid Precursor Protein
ATP	Adénosine triphosphate

B

BACE1	β -sécrétase 1
BMI1	B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1
BMP	Bone morphogenetic protein

C

CBX	Chrombox protein
Cdk	Protéine kinase dépendante des cyclines
CdkI	Protéine inhibitrice des Cdk
CGI	CpG islands
CpG	Dinucléotide Cytosine-Phosphate-Guanine
cPRC1	PRC1 canoniques
CS	Cellules souches
CSN	Cellules souches neurales

D

DAM	Disease-associated microglia
dAPP	Duplicated APP
DDR	DNA Damage Response
DFT	Démence frontotemporale
DLMT	Domaines de liaison aux microtubules
DRP	Domaine riche en proline

E

EB	Embryoid body
EED	Embryonic Ectoderm Development
ENF	Enchevêtrements neurofibrillaires
EOAD	<i>Early Onset Alzheimer's Disease</i>
EPOP	Elongin BC and PRC2-associated protein
ESC	Cellules souches embryonnaires
ESC	Embryonic stem cells
EZH	Enhancer of Zeste

F

FDG Pet	Tomographie par Émission de Positons
FD	Filaments droits
FHA	Filaments hélicoïdaux appariés
FTD	Dégénérescence frontotemporale

G

GABA	Acide γ -aminobutyrique
GD	Gyrus dentelé
GH	Growth Factor
GLU	Glutamate
GR	Glie radiaire
GRa	Glie radiaire apicale
GRb	Glie radiaire basale
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>

H

hiPSC	Cellules pluripotente induite humaine
hNPC	Cellule progénitrice neurale humaine
H2AK119Ub	Histone H2A ubiquitinated at lysine 119
HAS	Haute Autorité de Santé

I

IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
iPSC	Cellules pluripotentes induites
IRM	Imagerie à Résonance Magnétique

J

JARID2	Jumonji and (A+T) -rich interaction domain-containing protein 2
---------------	---

K

KLF4 *Kruppel-like factor 4*

L

LCOR Ligand Dependent Nuclear Receptor Corepressor

LCR Liquide céphalo-rachidien

lncARN Long ARN non codant

lncRNA XIST X-inactive specific transcript

LOAD *Late Onset Alzheimer's Disease*

LV Ventricules latéraux

M

MA Maladie d'Alzheimer

MAf Maladie d'Alzheimer familiale

MAPK/mTOR Mitogen-activated protein kinases/mammalian target of rapamycin

MAPT *Microtubule associated protein tau*

MAPT *Microtubule associated protein tau*

MAs Maladie d'Alzheimer sporadique

MDM2 *Mouse double minute 2 protein*

MMSE *Mini mental state examination*

MP Membrane plasmique

MPT Modifications post-traductionnelles

MT Microtubules

N

N Marqueurs associés à la neurodégénérescence

nAChR Récepteurs cholinergiques nicotiniques

ncPRC1 PRC1 non canoniques

NI *Non infected cells* (contrôle)

NINCDS-ADRDA National institute of neurological disorders and stroke -Alzheimer's disease related disorders association

NMDA Acide N-méthyl-D-aspartique

NPC Cellules progénitrices neurales

O

Oct4 *Octamer-binding transcription factor*

OMS Organisation Mondiale de la santé

ONU Organisation des Nations Unies

P

p-tau Protéine tau phosphorylé

PA	Plaques amyloïdes
PALI	<i>PRC2-associated LCOR isoform</i>
Pc	Polycomb
PcG	Groupe Polycomb
PCGF	<i>Polycomb group RING finger protein</i>
PCL	<i>Polycomb- like Protein</i>
PFC	Cortex préfrontal
PG	Progeniteurs basaux
PHC	<i>Polyhomeotic protein</i>
PoMiCS	<i>Postmitotic cellular senescence</i>
PPA	Aphasie progressive primaire
PRC	Protein Regulator of cytokinesis
PSEN1	Présénilines 1
PSEN2	Présénilines 2

R

RBBP4	<i>Retinoblastoma-Binding Protein 4</i>
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RYBP	<i>RING1 And YY1 Binding Protein</i>

S

sAPPα	Soluble APP α
sAPPβ	Fragment soluble APP β
SASP	<i>Senescence Associated Secretory Phenotype</i>
SB	Substance blanche
SCR	<i>Scramble infected cells</i>
SG	Substance grise
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
SNAP	<i>Suspected non-Alzheimer's pathology</i>
SNAREs	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
SNC	Système nerveux central
SOX2	<i>sex-determining region Y-box 2</i>
SUZ12	<i>Suppressor of Zeste</i>
SVA2	Protéine de vésicule synaptique 2

T

T	Marqueurs associés à tau
TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
TEP	Topographie par Émission à Positons
TNF-a	Tumor Necrosis Factor

TREM2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TrxG	Trithorax-group proteins
TSS	Transcription start site
V	
VZ	Zone ventriculaire
Y	
YAF2	YY1-associated factor 2
Z	
ZSV	Zone subventriculaire

Index des Figures

FIGURE 1 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DES MARQUEURS DU VIEILLISSEMENT.	26
FIGURE 2 : STRUCTURE DE LA PROTEINE APP ₆₉₅	40
FIGURE 3 : REPRESENTATIONS DES VOIES DE CLIVAGES CANONIQUES ET NON CANONIQUES DE L'APP.	41
FIGURE 4 : ILLUSTRATION DES FIBRILLES AB ET PA.	43
FIGURE 5 : ILLUSTRATION D'UNE CLASSIFICATION MORPHOLOGIQUE D'EPINES DENDRITIQUES.	44
FIGURE 6 : ILLUSTRATION DE LA PROTEINE TAU	45
FIGURE 7 : ILLUSTRATION DES FHA ET FD.	46
FIGURE 8 : GRADIENTS MORPHOGENETIQUES IMPLIQUES DANS LA REGIONALISATION DU SNC.	53
FIGURE 9 : METHODE DE DERIVATION DES CSN SELON DIFFERENTES COMBINAISONS DE FACTEURS.	55
FIGURE 10 : ILLUSTRATION DES DIFFERENTS TYPES DE CULTURES CELLULAIRES POUR L'ETUDE DE LA MA.	57
FIGURE 11 : LISTES NON EXHAUSTIVE DES AVANCEES SUR LA MA A L'AIDE DE MODELE IN VITRO.	58
FIGURE 12 : DETAIL STRUCTURAL D'UN NUCLEOSOME	64
FIGURE 13 : MODIFICATION POST-TRADUCTIONNELLE DES HISTONES.	65
FIGURE 14 : COMPOSITION DES PRC1 CANONIQUES ET NON CANONIQUES.	66
<i>FIGURE 15 : REPRESENTATION DU COMPLEXE PRC2 ET SES SOUS TYPES.</i>	<i>67</i>
FIGURE 16 : STRUCTURE CRISTALLINE DU DOMAINE CATALYTIQUE DES CPRC1 ET NCPRC1 INCLUANT BMI1.	69
FIGURE 17 : REGULATION ONCOGENIQUE ET DU CYCLE CELLULAIRE DE BMI1 PAR LA VOIE INK4/ARF.	71
FIGURE 18 : ILLUSTRATION DU MODELE PROPOSE PAR FLAMIER ET AL. CONDUISANT A LA MA.	72
FIGURE 19 : RESUME GRAPHIQUE DE L'ARTICLE 1 DE LA PARTIE IN UTERO	76

FIGURE 20 : RESUME GRAPHIQUE DE L'ARTICLE 2 DE LA PARTIE BMI1.	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
FIGURE 21 : CHRONOLOGIE DU PROCESSUS DE CORTICOGENESE ET DE MATURATION NEURONALE CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS.....	166
FIGURE 22 : ILLUSTRATION DES PARAMETRES MESURES POUR LES EPINES DENDRITIQUES	168
FIGURE 23 : ILLUSTRATION DE LA TECHNIQUE DE 10X GENOMIC	170
FIGURE 24:MECANISME D'INTERVENTION DE BMI1 DANS LA MAS.....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.
FIGURE 25 : VISUALISATION DES GREFFES A 2 SEMAINES APRES TRANSPLANTATION.	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

Index des Tableaux

TABLEAU 1 : TABLEAU COMPARATIF DES DIFFERENTES FORMES DE LA MA.....	35
TABLEAU 2 : CLASSIFICATION ATN SELON JACK ET COLLEGUES.....	37
TABLEAU 3 : TABLEAU DES DIFFERENTES LIGNEES ETABLIES DANS LE LABORATOIRE.....	ERREUR !

SIGNET NON DEFINI.

Tables des Matières

RESUME	4
ABSTRACT.....	5
REMERCIEMENTS	6
TABLES DES ABREVIATIONS.....	10
INDEX DES FIGURES.....	15
INDEX DES TABLEAUX	17
TABLES DES MATIERES	18
INTRODUCTION	22
CHAPITRE 1 : LE VIEILLISSEMENT.....	23
1. <i>Épidémiologie du vieillissement.....</i>	<i>23</i>
2. <i>Les théories du vieillissement.....</i>	<i>24</i>
3. <i>Les marqueurs du vieillissement</i>	<i>25</i>
3.1. Le groupe primaire	26
3.2. Le groupe antagoniste	28
3.3. Le groupe intégratif.....	28
4. <i>Le vieillissement du cerveau</i>	<i>30</i>
4.1. Généralités.....	30
4.2. Neurogénèse et vieillissement.....	31
4.3. Altération structurale et déclin cognitif.....	31
4.3.1. Changements morphologiques.....	31
4.3.2. Vieillissement et neurotransmission	32
4.3.3. Vieillissement et démence	32
CHAPITRE 2 : LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	33
1. <i>Présentation de la MA.....</i>	<i>33</i>
2. <i>Étiologie de la MA</i>	<i>34</i>
2.1. Forme familiale (MAf) et sporadique (MAs) de la MA.....	34
2.2. Forme alternative de la MA	35
3. <i>Diagnostic clinique</i>	<i>36</i>
3.1. Diagnostiquer la MA.....	36
3.2. L'état préclinique	38
3.3. Émergence de nouveaux biomarqueurs.....	38
4. <i>Les marqueurs cellulaires de la maladie d'Alzheimer.....</i>	<i>39</i>
4.1. La pathologie Amyloïde β	39
4.1.1. La protéine précurseur amyloïde APP et son rôle physiologique.....	39
4.1.2. Processus de clivage de l'APP	40
4.1.3. Formation des plaques amyloïdes.....	42

4.1.4. Neurotoxicité de l'Aβ et théorie amyloïde.	43
4.2. La pathologie tau	44
4.2.1. La protéine tau	44
4.2.2. Formation des enchevêtrements neurofibrillaires.....	45
4.2.3. La théorie tau	46
4.3. La Neuroinflammation	47
4.3.1. Microglie et MA	47
4.3.2. Astrocytes et MA	48
5. <i>Les facteurs de risques, Prévention et Traitement</i>	48
6. <i>Traitement et stratégie thérapeutique</i>	50
CHAPITRE 3 : MODELISER LA MA	52
1. <i>Les modèles in vitro</i>	52
1.1. Introduction au neurodéveloppement.....	52
1.1.1. Mise en place du système nerveux central.....	52
1.1.2. Neurogénèse, différenciation et migration neuronale.....	53
1.2. Modéliser la MA	54
1.2.1. ESC et IPSC.....	54
1.2.1. Les modèles de la MA	55
2. <i>Les modèles in vivo</i>	59
2.1. Les souris transgéniques (Tg)	59
2.2. Les modèles combinés	61
CHAPITRE 4 : LE MODELE BMI1	64
1. <i>Régulation de l'expression génique et groupe polycombs (PcG)</i>	64
1.1. Introduction à la régulation génique.....	64
1.1. Les PcG	65
1.1.1. Les PRC1	66
1.1.2. Les PRC2	67
1.1.3. Recrutement des PcG et répression génique.....	67
2. <i>La protéine BMI1 et son rôle physiologique</i>	69
2.1. La protéine BMI1	69
2.2. Rôle physiologique.....	70
3. <i>BMI1, vieillissement et Alzheimer</i>	71
OBJECTIFS DE LA THESE	74
RESULTATS – PARTIE IN UTERO	75
RESUME.....	76
CHAPITRE DE LIVRE : MODELES DE SOURIS HUMANISEES CHIMERIQUES POUR L'ETUDE DU DEVELOPPEMENT NEURONAL HUMAIN ET LA PATHOGENESE DES MALADIES CEREBRALES	79
ARTICLE 1 : CHANGEMENT DEVELOPPEMENTAUX DE PROGENITEURS NEURONAUX HUMAINS GREFFES DANS LE SYSTEME VENTRICULAIRE ET LE CORTEX PREFRONTAL DE CERVEAU DE SOURIS IN UTERO.....	105
RESULTAT – PARTIE BMI1	132
RESUME.....	ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

ARTICLE 2 : CONSEQUENCES DE L'INHIBITION DE BMI1 DANS DES NEURONES HUMAINS DERIVES D'IPSC	
GREFFEES DANS LE CORTEX PREFRONTAL DU CERVEAU DE SOURIS ADULTE.....	136
DISCUSSION	163
REFERENCES	180
BIBLIOGRAPHIE.....	181
OUVRAGES :	198
SITOGRAFIE	198

Introduction

L'introduction de ma thèse s'articulera autour de 4 axes. Le premier abordera la thématique du vieillissement. Il sera suivi d'un chapitre sur la maladie d'Alzheimer puis des approches permettant de modaliser cette pathologie. Enfin, le dernier chapitre traitera du rôle de BMI1, protéine d'intérêt dans le cadre de mes travaux, et de sa relation avec la maladie d'Alzheimer.

CHAPITRE 1 : LE VIEILLISSEMENT

1. Épidémiologie du vieillissement

D'après l'Organisation des Nations Unies (ONU), le vieillissement de la population mondiale est en passe de devenir l'une des transformations sociales la plus importante de ce siècle. Depuis 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a engagé un plan décennal visant à améliorer les conditions de vie des personnes âgées. Cette décennie du « bien vieillir » fait référence au « processus de développement et de maintien des aptitudes fonctionnelles qui permet aux personnes âgées de jouir d'un état de bien-être. » (OMS, <https://www.who.int/fr/initiatives/decade-of-healthy-ageing>).

En 2019, l'ONU publie un rapport sur les prédictions démographiques pour les prochaines décennies et les conséquences médicales et socio-économiques. La population mondiale en hausse devrait atteindre 10 milliards d'habitants en 2100. Cette augmentation n'est pas homogène selon les catégories de population que sont les enfants (0-14 ans), les jeunes (15-24 ans), les « actifs » (25-64 ans) et les personnes âgées (≥ 65 ans). D'après ce rapport ONU et pour 2050, la population mondiale des personnes âgées de plus de 65 ans passerait de 6% actuellement à 16% dépassant ainsi la proportion de jeunes qui diminuerait de 19 à 14%. La proportion des actifs augmenterait également mais 2 fois moins que celle des personnes de 65 ans et plus. Plus concrètement, les personnes âgées passeront globalement de 703 millions actuellement à 1.5 milliard en 2050. Il est à noter que cette augmentation ne sera pas non plus homogène géographiquement. Aujourd'hui la majorité des personnes âgées se concentre à l'Est de l'Asie et en Asie du Sud-Est (37%) suivi par l'Europe et l'Amérique du Nord (29%). Même si cette croissance des personnes âgées est mondiale, son augmentation elle sera beaucoup plus importante dans les pays les moins développés. L'Afrique du Nord et l'ouest de l'Asie ainsi que l'Afrique subsaharienne verront une augmentation de 226% et 218% respectivement. En comparaison, le nombre de personnes âgées en Europe et en Amérique du Nord n'augmentera que de 48%. Malgré ces augmentations contrastées, l'Asie du Sud-Est et l'Est de l'Asie conserveront la plus grande proportion de personnes âgées avec une prédiction atteignant les 573 millions de personnes en 2050 (United Nations, 2020).

Cette augmentation globale des 65 ans et plus peut s'expliquer de manière multifactorielle. Elle est le résultat d'une amélioration des conditions sociales et économiques, associée aux avancées médicales. Ceci a pour conséquence une diminution de la mortalité infantile et une meilleure longévité. Un des exemples les plus flagrants est celui de l'Afrique subsaharienne qui, depuis les années 1990 jusqu'à 2019, a vu son espérance de vie passer de 49,1 ans à 60,5 ans. Ce phénomène devrait se poursuivre pour atteindre les 68.1 ans en 2050.

Les personnes âgées sont considérées comme une catégorie de personnes qui produit peu mais qui consomme beaucoup (United Nations, 2020). Ces changements en proportions vont mener à une certaine pression des systèmes économiques et sociaux mondiaux. C'est d'ailleurs l'objectif du plan décennal de l'OMS abordé précédemment, que d'appréhender et de faire en sorte que ce vieillissement de la population se fasse dans les meilleures conditions. Le vieillissement est un facteur important de nombreuses maladies comme les cancers ou les maladies neurodégénératives, dont il est admis aujourd'hui, que la prévention joue un rôle essentiel dans leur retardement ou leur évitement.

2. Les théories du vieillissement

Contrairement aux processus qui régissent le développement humain dont la nature programmée est acceptée, l'origine de ceux qui conduisent au vieillissement est toujours controversée. D'un point de vue biologique et de manière générale, le vieillissement peut se définir comme une diminution progressive des fonctions biologiques et une augmentation de la mortalité liées à l'âge (Libertini, 2019).

Depuis les années 50, différentes théories ont émergé pour tenter de comprendre l'origine évolutive du vieillissement, c'est-à-dire s'il résulte plutôt d'un processus adaptatif et régulé ou s'il est le produit de conséquences de mutations génétiques hasardeuses et de modifications épigénétiques. De nos jours, quatre d'entre elles sont régulièrement décrites : les deux premières ont été développées dans les années 1950. La théorie des radicaux libres énoncée en 1956 par le médecin chimiste biologiste et gérontologiste Denham Harman est essentiellement basée sur le dysfonctionnement métabolique. Selon lui, la production et l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) seraient à l'origine des dommages cellulaires au cours du temps et donc du vieillissement (Harman, 1956). L'autre théorie, portée par les Dr. Medewar et Dr. G. Williams se dit évolutive. Elle s'appuie sur la présence d'allèles et de mutations, pouvant être favorable ou non durant le développement de l'organisme, qui deviendrait délétère à un stade plus avancé de la vie. Cette théorie inclut à la fois le concept d'accumulation de mutations génétiques et celui de pléiotropie antagoniste (Schmeer et al., 2019). Une cinquantaine d'années plus tard, le Dr. Longo propose une nouvelle théorie du vieillissement dit programmé et altruiste pour laquelle le vieillissement et la mort des individus seraient déterminés au profit des proches ou de manière plus globale, au profit de la population (Longo et al., 2005). La plus récente théorie a été proposée par le Dr. Blagosklonny en 2013 et défend le fait que le vieillissement ne peut être en lui-même programmé mais qu'il n'est que le prolongement du processus quasi-programmé de croissance développementale (Blagosklonny, 2013). Il y introduit le concept de géroconversion (ou conversion gérogénique) qu'il définit comme une forme de croissance cellulaire, principalement portée par la voie de signalisation MAPK/mTOR (Blagosklonny, 2014). Cette géroconversion permet l'entrée de la cellule

dans un état hyper-mitogénique conduisant ensuite à un dérèglement cellulaire. Elle serait donc associée à l'apparition de maladies liées au vieillissement et *in fine*, entraînerait la mort des individus.

Schmeer et al. redéfinissent les différents points de vue en 4 catégories qui partagent des caractéristiques communes. L'approche « causative stochastique » (accumulation d'évènements toxiques associés à une diminution des capacités de réparation entraînant une détérioration cellulaire et un vieillissement chronique) ; l'approche « causative pseudo-programmée » (le vieillissement n'est pas programmé et n'est que l'ombre du programme de croissance développemental), l'approche « causative programmée » et enfin, « l'approche causative stochastique mais programmée » (un « délétériome » non neutralisé par les mécanismes compensatoires individuels serait à l'origine du vieillissement) (Schmeer et al., 2019). A elles seules, ces théories ne permettent pas de conclure sur l'origine du vieillissement. Néanmoins, elles contribuent à la compréhension des différents marqueurs qui sont décrits dans la section suivante.

3. Les marqueurs du vieillissement

Malgré le fait que le « pourquoi » du vieillissement soit toujours débattu, ses marqueurs moléculaires et cellulaires sont quant à eux bien établis. Dans leur revue publiée en 2023, Lopez-Cotin et al. reprennent les quelques 300 000 articles publiés durant les 10 dernières années au sujet des différentes marques du vieillissement et les classifient en 3 groupes : primaire, antagoniste et intégratif, qui feront l'objet d'une description détaillée. Il est important de considérer que l'ensemble de ces marques sont interconnectées et que le vieillissement se doit d'être perçu comme un phénomène multifactoriel.

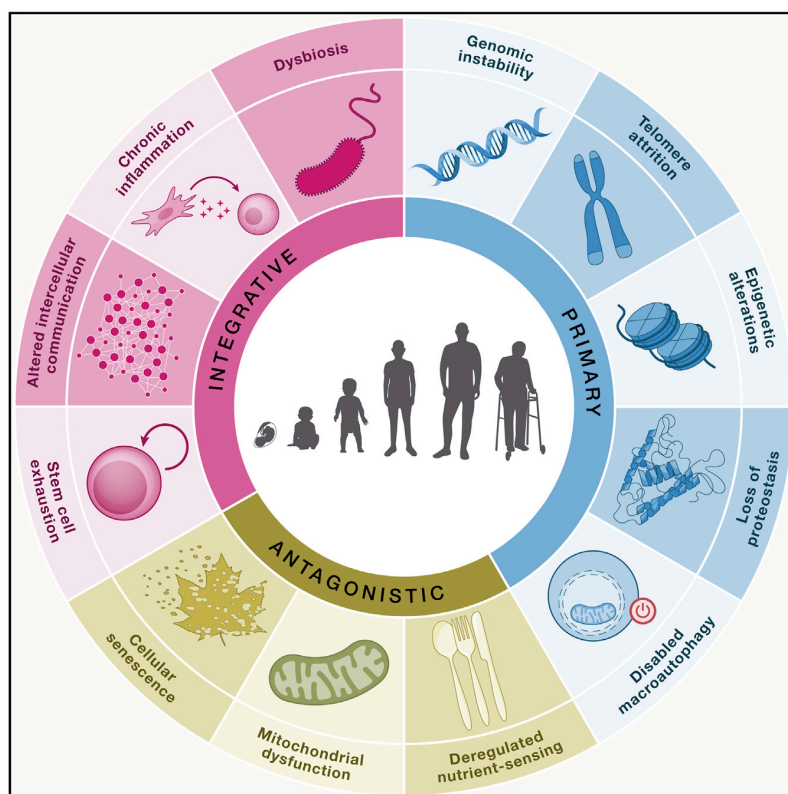


Figure 1: Représentation graphique des marqueurs du vieillissement. Les différents signes cellulaires et moléculaires sont regroupés en 3 groupes : primaire (bleu), antagoniste (vert) et intégratif (rouge) (D'après López-Otín et al., 2023).

3.1. Le groupe primaire

Ce groupe reflète les dommages liés à l'instabilité génomique, l'attrition télomérique, aux altérations épigénétiques, à la perte de la protéostasie et à l'altération de la macro-autophagie.

L'instabilité et l'intégrité génomique sont constamment mis à l'épreuve et concernent autant l'acide désoxyribonucléique (ADN) nucléaire (ADNn) que mitochondrial (ADNmt). L'origine des agressions à l'ADN est variée et peut être endogène comme l'exposition aux ROS, ou exogène comme l'exposition aux radiations, aux rayonnements ou encore à des agents chimiques. Ces différentes agressions peuvent aboutir à des mutations, des insertions ou délétions ou encore, une aneuploïdie chromosomique (nombre anormal de chromosomes). Au cours du temps, le mécanisme de réparation de l'ADN perd en efficacité et les dommages de l'ADN s'accumulent compromettant l'intégrité et la stabilité génomique. L'ADNmt y est d'autant plus sensible que son système de réparation est moins performant et qu'il baigne dans un environnement oxydatif qui lui est propre. Bien que les données actuelles, laissent à penser que l'atténuation ou la correction des dommages de l'ADNmt pourrait

permettre une meilleure longévité, il n'est pas encore établi que ces phénomènes jouent un rôle prépondérant dans le vieillissement.

L'attrition télomérique contribue indéniablement à l'instabilité génomique. Pour autant, elle peut être considérée comme une marque à part du fait qu'elle joue également un rôle dans la protection contre les cancers en diminuant la capacité de réplication des cellules malignes. Les télomères sont de courtes séquences d'ADN, répétées en tandem, situées à la fin des chromosomes et associées à des protéines protectrices dont la fonction principale est d'assurer l'intégrité génomique des chromosomes. Du fait de l'incapacité du système de réplication à copier la totalité des extrémités des chromosomes, les télomères raccourcissent au fur et à mesure des divisions cellulaires. Ce phénomène, appelé attrition cellulaire, compromet avec l'intégrité génomique poussant la cellule vers la sénescence ou l'apoptose (Blackburn et al., 2015).

L'épigénétique a également sa part de responsabilité dans le vieillissement. Elle correspond aux changements de l'activité des gènes pouvant être transmissibles lors de la division cellulaire. C'est un processus stable, dynamique mais réversible contrairement aux mutations génétiques qui modifient intrinsèquement la séquence des gènes. L'épigénétique inclut des modifications post-traductionnelles des histones qui modifient le repliement de la chromatine et l'accessibilité des gènes à la machinerie transcriptionnelle. Au cours du temps, ces événements peuvent être altérés et les protéines qui sont impliquées rendues dysfonctionnelles.

Une autre cause majeure du vieillissement est la perte de la protéostasie ou homéostasie protéique qui se traduit par l'accumulation de protéines mal repliées, oxydées, glyquées, ou ubiquitinylées qui s'agrègent et forment des inclusions intracellulaires ou des plaques extracellulaires. De nombreuses pathologies associées au vieillissement telles que les cancers ou les maladies neurodégénératives dont la MA en résultent. Ce déséquilibre peut être expliqué en partie par une diminution de l'activité des organites intracellulaires en charge de l'élimination des protéines oxydées, les protéasomes.

Enfin, la macro-autophagie est un mécanisme qui, par le recyclage et l'élimination à la fois de protéines altérées, d'intrusions virales et bactériennes, permet aux cellules de survivre et de s'adapter. La déficience de ce processus fait également partie des marques primaires du vieillissement.

3.2. Le groupe antagoniste

Ce groupe inclut des processus dont le rôle dans le vieillissement est plus nuancé voir encore débattu. Il s'agit de la dérégulation de la détection cellulaire des nutriments, de la dysfonction mitochondriale et la sénescence cellulaire.

De nombreuses études ont montré que, d'une manière générale et quel que soit l'espèce eucaryote, une diminution du régime alimentaire permettait d'améliorer la durée de vie des organismes. Les cellules disposent de voies de signalisation qui leur permettent de faire un état des lieux de la disponibilité en nutriments. Ces détecteurs de nutriments ou « nutrient sensing » correspondent principalement à la voie de l'hormone de croissance (GH, pour « Growth Factor » en anglais) et du facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1 pour « Insulin-like Growth Factor 1 » en anglais). Leur activité est positivement corrélée à la disponibilité en nutriments. Il a d'ailleurs été montré que la présence de mutations ou de polymorphismes altérant la fonction de la GH, de IGF-1 ou encore des voies en aval de ces deux protéines ont un effet majeur sur la longévité des organismes.

Les mitochondries contribuent à l'équilibre énergétique des cellules en fournissant notamment l'énergie aux différentes voies métaboliques nécessaires au maintien et à la survie cellulaire. Au cours du temps, cet équilibre est compromis par la détérioration de la fonction mitochondriale, en plus de la surproduction de ROS dont l'impact sur le matériel génétique à précédemment été décrit.

L'état de sénescence se définit comme l'arrêt définitif de la prolifération cellulaire et se caractérise par une diminution de l'activité des protéines kinases dépendantes des cyclines (Cdk) et d'une augmentation de l'activité des protéines inhibitrices des Cdk (CdkI). A cela s'ajoute également l'activation de la voie de la réponse des dommages à l'ADN (DDR) et à terme, l'apoptose (Schmeer et al., 2019). Chez l'homme, les cellules sénescents s'accumulent au cours du temps et il a été montré que la durée de vie pouvait être rallongée lorsqu'elles sont éliminées par des approches génétiques ou pharmacologiques. Toutefois la responsabilité de la sénescence dans le vieillissement reste toujours débattue actuellement.

3.3. Le groupe intégratif

Ce groupe intègre des marqueurs du vieillissement résultant des dysfonctionnements et des altérations intracellulaires précédemment discutés mais dont la dimension est cette fois méta-cellulaire. Il s'agit de l'épuisement des cellules souches (CS), l'altération de la communication intercellulaire, l'inflammation chronique ainsi que la dysbiose.

Les CS ne font pas exception et sont-elles aussi soumises aux différentes marques du vieillissement. Leur épuisement avec l'âge constitue un des marqueurs du vieillissement en tant que tel, du fait de l'altération de la capacité de réparation et de réjuvenation des tissus. Cette diminution de la disponibilité en CS concerne à la fois les tissus à forte capacité de régénération comme la peau et les muscles mais aussi les tissus dont la capacité de régénération est plus faible comme l'intestin, les poumons ou le cerveau.

Le vieillissement se caractérise également par une altération de la communication intercellulaire. Celle-ci peut se faire par juxtaposition ou alors par la voie paracrine ou endocrine. Des recherches menées sur des modèles murins ont pu mettre en évidence l'importance de facteurs pro- et antivieillessement (Katsimpardi et al., 2014) dans le sang mettant en avant la voie systémique comme nouvelle cible de recherche sur le vieillissement.

L'inflammation est un processus complexe qui permet l'élimination d'agents pathogènes, la réparation et le rétablissement des tissus. Lorsque celui-ci est transitoire, l'inflammation est dite aiguë. Il arrive que dans certaines conditions l'inflammation s'installe et devienne chronique, c'est le cas au cours du vieillissement. Cette persistance de l'inflammation s'explique en partie par une diminution de l'efficacité du système immunitaire. Les autres marqueurs du vieillissement précédemment décrits jouent également un rôle prépondérant dans l'inflammation chronique. Un exemple est l'accumulation des cellules sénescents (groupe antagoniste) dans les tissus. Ces cellules synthétisent un ensemble de cytokines et de chimiokines connu également sous le nom de SASP pour « *Senescence Associated Secretory Phenotype* » en anglais qui diffèrent d'un type cellulaire à un autre. Ce sécrétome est essentiel à de nombreux processus cellulaires et est impliqué dans la sénescence autocrine des cellules avoisinantes, favorisant ainsi l'accumulation de cellules sénescents au cours du temps. En outre, il permet, via la signalisation paracrine, d'induire une réponse immunitaire (Schmeer et al., 2019). De ce fait, l'accumulation de cellules sénescents peut être associée à une augmentation de l'inflammation chronique au cours du vieillissement. Le fait que la modulation du système immunitaire, notamment via l'expression de la cytokine $TNF-\alpha$, ait une action sur la vitesse du vieillissement explique que l'inflammation chronique puissent être perçue comme un marqueur du vieillissement à part entière.

Enfin le dernier marqueur décrit par Lopez-Cantin et collègues est la dysbiose ou déséquilibre du microbiote intestinal. La diversité écologique du microbiote intestinal est établie durant l'enfance et varie peu dans sa nature au cours de la vie. En revanche, ces populations microbiennes sont dynamiques et le profil taxonomique quant à lui change au cours du temps et selon les individus. Il a été montré que le changement dans la composition du microbiote est lié au vieillissement et qu'il a un impact direct entre autres sur l'inflammation systémique chronique et les altérations métaboliques.

Du fait l'ensemble de ces altérations et cette difficulté à maintenir des systèmes de réparation et de défense fonctionnelle font que le vieillissement est le facteur aggravant principal de nombreuses pathologies.

4. Le vieillissement du cerveau

4.1. Généralités

Le système nerveux central humain (CNS) est composé d'environ 86 milliards de cellules nerveuses (neurones) et d'au moins autant de cellules gliales (glie). Les neurones sont des cellules hautement différenciées, spécialisées dans la transmission nerveuse et présentent à ce titre une arborisation extrêmement complexe et variée. La glie inclut les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales. Ces cellules interviennent dans la préservation de l'environnement cérébral, dans la modulation de la transmission nerveuse, dans la protection et la réparation des lésions et enfin, participent à la barrière immunitaire du SNC.

Les cellules nerveuses et gliales ne font pas exception et sont, elles aussi, soumises aux mécanismes du vieillissement précédemment détaillés. Pour autant, elles présentent des particularités mises en avant par de récentes études. Récemment, il a été mis en évidence grâce au séquençage du génome entier sur cellule unique, que l'accumulation des mutations au sein de l'ADN génomique des neurones est dépendante de l'âge et de la région cérébrale, avec une accumulation plus importante dans le gyrus dentelé de l'hippocampe, région impliquée dans la mémoire (Lodato et al., 2018). La stabilité des télomères au sein des cellules post-mitotiques a elle aussi été remise en question par une étude publiée en 2018 qui montre le dynamisme des télomères des populations neuronales et gliales dont la longueur varie selon l'âge mais pas nécessairement du cycle cellulaire. Les auteurs expliquent que ce phénomène pourrait résulter d'une accumulation de ROS au cours du temps (Ain et al., 2018).

La sénescence s'applique par définition aux cellules mitotiques. Pourtant, depuis quelques années, les recherches indiquent que les cellules post-mitotiques dont les neurones, sont également capable d'entrer dans un état mimant celui de la sénescence. Il a été démontré que ce phénotype, appelé PoMiCS pour « postmitotic cellular senescence » ou « amitosenescence » est également associé à la sécrétion de SASP et participe donc au vieillissement et à la progression des maladies qui lui sont apparentées (Wengerodt et al., 2019).

4.2. Neurogénèse et vieillissement

Dans le SNC la neurogénèse chez l'adulte fait toujours débat dans la communauté scientifique mais semble relativement bien acceptée et considérée comme faisant partie intégrante de la plasticité cérébrale. Elle est restreinte à 2 régions cérébrales qui sont la zone subventriculaire (ZSV) et le gyrus dentelé (GD) de l'hippocampe. Ces niches correspondent à un microenvironnement composé d'un mélange de cellules hétérogènes incluant les cellules souches neurales (CSN), des cellules gliales, des cellules ependymales et endothéliales. Les CSN représentent un pool de progéniteurs en état de quiescence, capables de proliférer et de se différencier en réponse à certains stimuli.

Du fait de l'accumulation des dommages cellulaires lié à l'âge, les CSN perdent leur capacité à proliférer et de ce fait diminue chroniquement fortement quelle que soit la région. Des expériences de parabiose impliquant le partage du système circulatoire entre souris adultes jeunes et âgées ont pu mettre en évidence que la présence du sang de la souris jeune dans le système circulatoire de la souris âgée permettait d'augmenter la neurogénèse. A l'inverse, la neurogénèse de la souris jeune a diminué indiquant un impact négatif du vieillissement sur la neurogénèse adulte. De plus, l'activation de la microglie et la libération de cytokines des cellules voisines créent un environnement toxique qui altère leur survie et participe donc à la diminution de la neurogénèse chez l'adulte au cours du vieillissement (Katsimpardi and Lledo, 2018).

4.3. Altération structurale et déclin cognitif

4.3.1. Changements morphologiques

Les changements cellulaires et moléculaires liés au vieillissement entraînent des altérations au niveau tissulaire. Concernant le cerveau, elles se traduisent par une atrophie cérébrale et une perte de gyrfication corticale associées à une hypertrophie des ventricules et sillons cérébraux. Cette atrophie est observée au cours du vieillissement normal et s'applique à la fois à la substance grise (SG) composée des corps cellulaires et prolongements non myélinisés, et à la substance blanche (SB) comprenant essentiellement les axones. Elle concerne de manière plus importante le lobe frontal, temporal et la région de l'hippocampe. La perte volumique de la SG s'explique par une perte neuronale, une diminution du volume des corps cellulaires et une perte de l'arborisation et de la complexification des prolongements neuronaux. Ces altérations entraînent une diminution de la densité synaptique et des changements dans la structure corticale. La perte volumique de la substance blanche résulte d'une dégénérescence axonale accompagnée d'une démyélinisation et de lésions qui entraînent une

neuroinflammation (Blinkouskaya et al., 2021). Ces changements ont un impact sur la neurotransmission et sont à l'origine du déclin cognitif associé au vieillissement.

4.3.1. Vieillissement et neurotransmission

Les neurones communiquent entre eux majoritairement par l'intermédiaire de nombreux messagers chimiques, les neurotransmetteurs libérés au niveau des fentes synaptiques. Le glutamate (GLU) est le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux. La neurotransmission inhibitrice est essentiellement assurée par l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Plus de 100 substances sont reconnues comme pouvant servir de neurotransmetteurs et sont classifiées selon leur taille. On distingue ainsi les neuropeptides des neurotransmetteurs à petites molécules qui incluent entre autres, le glutamate, le GABA, l'Acétylcholine (ACh) et les monoamines comme la dopamine, la sérotonine ou encore l'histamine. Le système de neurotransmission s'altère au cours du vieillissement et concerne autant la synthèse des neurotransmetteurs, leurs récepteurs que leur métabolisme. Cette altération a pour conséquence une dégradation des processus cognitifs dont l'apprentissage, la mémorisation et l'attention.

4.3.2. Vieillissement et démence

Pour des causes génétiques et/ou environnementales, certains marqueurs du vieillissement s'accroissent et conduisent à des pathologies. Parmi les plus citées, on retrouve les maladies visuelles et auditives, les maladies cardiovasculaires, les cancers et les maladies neurodégénératives dont fait partie la démence. D'après l'OMS, la démence est la 7ème cause de décès dans le monde. Il est estimé que le nombre de personnes qui en souffrent a progressé de 117% entre 1990 et 2016 et concerne aujourd'hui plus de 50 millions de personnes. Bien que l'incidence de la démence soit à la baisse dans les pays occidentaux grâce à une meilleure prévention et prise en charge des maladies cardiovasculaires, la prévalence est quant à elle prévue à la hausse pour atteindre 152 millions de cas d'ici 2050. Cette augmentation s'explique principalement par le vieillissement d'une population croissante. La prévalence de la démence est à l'image du vieillissement et il est donc attendu que 2/3 des cas se concentrent dans les pays à bas revenus (Nichols et al., 2022; Scheltens et al., 2021). La démence est un syndrome clinique causé par différentes pathologies et qui se définit par un déclin progressif des capacités cognitives suffisant pour impacter la vie quotidienne. Elle représente la cause majeure de handicap et de dépendance chez les personnes âgées.

La MA, qui représente 60 à 70% des cas, est la forme principale de démence. Le prochain chapitre lui est dédié.

CHAPITRE 2 : LA MALADIE D'ALZHEIMER

1. Présentation de la MA

La MA tient son nom du médecin Aloïs Alzheimer qui en a fait la découverte en 1907. Sa patiente, Auguste Deter, souffrait alors de troubles du sommeil, de la mémoire et de l'humeur associés à une confusion progressive. Par des techniques d'immunomarquage post-mortem, Aloïs Alzheimer décrit pour la première fois les marqueurs principaux de la maladie que sont une atrophie cérébrale associée à la présence de plaques amyloïdes (PA) dans les couches corticales supérieures et la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires (ENF) (Hippius and Neundörfer, 2003). De nos jours, ces marqueurs servent toujours de base au diagnostic de la MA mais sont complétés par de nouveaux marqueurs tels que la présence de la protéine amyloïde β_{1-42} , espèce majoritaire des PA, de la protéine tau phosphorylée (p-tau) composante des ENF ainsi que la neuroinflammation, la perte synaptique et la perte neuronale (ou neurodégénérescence).

Bien que la MA soit maintenant définie comme un continuum, elle peut être communément divisée en 3 phases. La première, la phase préclinique, se caractérise par la présence d'au moins un des marqueurs cellulaires sans présenter de déficits cognitifs. Cette phase asymptomatique peut se développer de nombreuses années voire des décennies avant l'apparition des premiers symptômes cognitifs qui marquent alors l'entrée dans la seconde phase, la phase prodromique. La dernière correspond à celle de la démence et se caractérise par des déficits cognitifs si importants qu'ils altèrent la vie quotidienne et entraînent une perte d'indépendance. Elle peut être subdivisée en 3 stades selon sa sévérité : légère, modérée et sévère (Porsteinsson et al., 2021).

La MA impact la totalité du cerveau selon une temporalité et une hiérarchie précise qui peut néanmoins varier d'un individu à un autre. Elle se déclare tout d'abord dans des aires cérébrales différentes selon qu'il s'agisse de l'amyloïdopathie ou de la tauopathie. La première débute au niveau du néocortex qui inclut le cortex préfrontal (PFC). Cette région, impliquée dans de nombreux processus cognitifs comme l'attention, la mémoire de travail ou encore la prise de décision (Carlén, 2017), fera l'objet d'une attention particulière dans ce manuscrit. La pathologie amyloïde s'étend ensuite progressivement à l'allo cortex et au système limbique avant d'atteindre les autres régions du cerveau tandis que la tauopathie apparaît en premier lieu au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe puis s'étend au niveau du système limbique pour finalement se propager dans le néocortex (Van Der Kant et al., 2020).

2. Étiologie de la MA

La MA est une pathologie complexe et multifactorielle. De manière générale, il est possible de distinguer celle dont les symptômes cliniques se déclenchent avant 65 ans (EOAD pour « *Early Onset Alzheimer's Disease* » en anglais) de celles dont les symptômes se déclenchent après cette limite (LOAD pour « *Late Onset Alzheimer's Disease* ») (Nardini et al., 2021).

2.1. Forme familiale (MAf) et sporadique (MAs) de la MA

Dans moins de 1% des cas, la MA se présente sous la forme d'une maladie héréditaire dominante. Elle est le résultat de mutations génétiques autosomales à pénétrance complète dans les gènes codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde (*APP*) et des présénilines 1 (*PSEN1*) ou 2 (*PSEN2*), des sous unités de la γ -secrétase, protéine impliquée dans le clivage de cette dernière. Les mutations du gène *PSEN1* couvrent 69% des cas de la MA dans sa forme génétique. Les duplications et mutations du gène *APP* sont à l'origine de 7,5% et 13% des cas respectivement tandis que les mutations du gène *PSEN2* ne compte que pour 2% des cas. Globalement, plus de 430 mutations dans ces gènes ont été mis en évidence. Elles ont pour conséquence une variabilité dans le phénotype et dans le début d'apparition des symptômes (Rujedawa et al., 2021). Une des caractéristiques de la MAf est que l'apparition des symptômes se fait généralement plus précocement que dans la forme majoritaire. Elle correspond à la forme principale des EOAD (Nardini et al., 2021). Cette spécificité peut s'expliquer par le fait que les individus présentant ces mutations, accumulent des changements physiologiques depuis le développement qui peuvent accélérer l'apparition des premiers symptômes.

L'étiologie de la forme majoritaire (>99% des cas) de la MA reste aujourd'hui toujours inconnue et de ce fait est appelée sporadique et se déclenche majoritairement après 65 ans. L'arrivée des symptômes cliniques avant cet âge est généralement corrélée avec un historique familial pour la MA non apparenté aux mutations autosomales précédemment décrites. Par conséquent, la MAs est souvent présentée comme LOAD.

Bien que le phénotype de ces deux formes apparaisse similaire d'un point de vue clinique (ex. altération de la mémoire épisodique) et physiopathologique (ex. présence de PA et de ENF) (Dubois et al., 2016), il présente également des différences qui s'étendent au-delà de l'âge d'apparition des symptômes (Rujedawa et al., 2021). Dans leur revue publiée en 2021, Rujedawa et ses collègues présentent un tableau comparatif des similarités et différences des deux formes de la MA fondé sur une recherche approfondie dans la littérature scientifique depuis les années 2000. Une version adaptée est présentée en Tableau 1.

	MAs	MAf			
Caractéristiques cliniques					
Moyenne d'âge d'apparition des symptômes cliniques	80.2 ± 6	PSEN1	PSEN2	APP	dAPP
		43.3 ± 8.6	58.1 ± 9.5	47.6 ± 7.1	51.5 ± 5.3
Moyenne d'âge de décès	86.1 ± 7.04	50.5 ± 9.7	71.8 ± 10.6	58 ± 8.4	60.4 ± 6.2
Angiopathie Cérébrale Amyloïde	Faible	Forte (Prévalence plus importante lors de la duplication du gène APP)			
Phénotypes amnésiques	Altération précoce de la mémoire épisodique précoce Altération précoce des capacités visu perceptives Déficit de l'Attention Détérioration du langage	Perte de la mémoire épisodique précoce Perte précoce des capacités visu perceptives Déficit de l'Attention Détérioration du langage (mutation dépendant)			
Phénotypes non-amnésiques (ex: changement comportementaux, altération exécutive etc.)	Moins commun	Plus commun			
Symptômes neurologiques (Ex: Épilepsie)	Moins commun	Plus commun			
Neuropathologie et Neuroimagerie					
Altération de la connectivité "mode par défaut"	Présent	Présent			
Changements biochimiques	Similaire en magnitude et direction	Similaire en magnitude et direction			
Distribution des dépôts d'Aβ	Similaire	Similaire			
Hypométabolisme	Similaire	Similaire			
Atrophie	Similaire	Similaire (mais accéléré)			
Distribution de tau	Similaire	Similaire			

Tableau 1 : Tableau comparatif des différentes formes de la MA.
(Adapté de Rujedawa et al., 2021)

2.2. Forme alternative de la MA

La MA peut se manifester sous des phénotypes atypiques dites « non amnésiques » et concernent essentiellement les formes précoces de la MA (MAs-EOAD et MAf) (environ 30% des cas). Les plus répandues sont les variantes spatio-visuelle, linguistique et frontale.

La variante spatio-visuelle se distingue principalement de la forme classique par un hypométabolisme et une atrophie corticale postérieure ou ACP, plus particulièrement des régions occipito-pariétales et occipito-temporales. Elle se traduit entre autres cliniquement par des troubles de la coordination visuomotrice (ataxie optique, apraxie oculo-motrice) et des difficultés de perception de l'espace, d'objets et de visages.

La variante linguistique concerne environ 7 à 9% des cas d'EOAD et se caractérise par une aphasie progressive primaire (PPA) pouvant se mettre en place de nombreuses années avant l'apparition d'autres symptômes. Il en existe de manière générale 3 types : non fluentes/agrammatiques, sémantiques

et logopéniques (difficulté à trouver ses mots). Cette dernière constitue le type majoritaire dans la variante linguistique de la MA et se traduit par des difficultés à trouver ses mots et de prononciation associées à des déficits de répétition de phrase. Ces formes représentent 30% des cas dans les formes précoces de la MA (MA_s-EOAD et MA_f) alors qu'elles ne concernent que 6% des cas de LOAD.

La variante frontale désigne en réalité 2 sous-variants : la variante exécutive et la variante comportementale qui ont été initialement caractérisées par la présence d'ENF au niveau du lobe frontal, région particulièrement connue pour son implication dans les fonctions exécutives et le contrôle cognitif. Elles se traduisent comme leur nom l'indique soit par un déclin prédominant des fonctions cognitives exécutives de base comme la mémoire de travail soit par une détérioration progressive du comportement tel que l'apathie. Cette dernière est souvent diagnostiquée à tort comme une démence frontotemporale du fait de déficits cognitifs similaires et pourrait donc représenter une plus grande proportion (Graff-Radford et al., 2021; Scheltens et al., 2021). L'ensemble de ces variants présentent des similitudes avec d'autres formes de démences et de ce fait engendre des erreurs de diagnostic. Ils confirment donc le besoin de nouveaux marqueurs permettant d'affiner le diagnostic de manière à affiner le diagnostic et donc une prise en charge adéquate.

3. Diagnostic clinique

3.1. Diagnostiquer la MA

Du fait de la complexité de la MA, le diagnostic met en jeu un ensemble d'intervenants du corps médical. En France, le médecin traitant est le premier à agir en prescrivant un dépistage en réponse aux plaintes subjectives du patient. Pour réaliser le dépistage, la Haute Autorité de Santé (HAS) recommande depuis 2011, un entretien avec le patient accompagné d'un proche, un examen clinique renseignant sur son état physique et la présence d'un quelconque déficit sensoriel, une évaluation fonctionnelle des activités courantes quotidiennes, ainsi qu'une évaluation cognitive globale à l'aide de test de mémorisation ou psychomoteur (« *mini mental state examination* » ou MMSE, test de l'horloge, etc.). Si les résultats du dépistage indiquent une probabilité d'atteinte par la MA, le médecin traitant redirige ensuite le patient vers un médecin spécialiste (<https://www.has-sante.fr>).

Le diagnostic repose sur des critères établis en 1984 par le NINCDS-ADRDA et revus en 2011. Ils comprennent des tests neuropsychologiques qui permettent d'évaluer les capacités cognitives telles que la mémoire, le langage ou encore la performance à la réalisation de tâches exécutives, accompagnés d'examens neurobiologiques basés essentiellement sur de l'imagerie cérébrale et la recherche de biomarqueurs dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (McKhann et al., 2011). La technique d'imagerie

à Topographie par Émission à Positons (TEP) permet en effet de vérifier la présence des protéines A β et tau mais aussi de mettre en évidence l'hypométabolisme de régions impliquées dans la MA. L'approche par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) permet d'observer l'atrophie cérébrale, caractéristique de la MA. Il est possible de compléter ces examens par des recherches, dans le LCR, d'une diminution d'A β ₁₋₄₂ et donc d'une altération du ratio A β ₁₋₄₀/d'A β ₁₋₄₂ concernant l'amyloïdopathie, et d'une augmentation de la protéine tau phosphorylée (Bjerke and Engelborghs, 2018). Le diagnostic de la MA ne pourra néanmoins être confirmé qu'à la suite d'une biopsie ou, post mortem lors d'une autopsie.

Les biomarqueurs de la MA ont récemment été classés en 3 catégories à savoir les marqueurs amyloïdes (A), les marqueurs tau (T) et les marqueurs liés à la neurodégénérescence (N) ou ATN comme exposé dans le tableau ci-dessous (Jack et al., 2018).

	A (Amyloïdes)	T (Tau)	N (Neurodégénérescence)
Imagerie	TEP Amyloïde	Cortical Tau TEP	IRM anatomique FDG TEP
LCR	Faible Ab1-42 Altération du ratioAb1-40/ Ab1-42	Augmentation de p-tau	Protéine tau total

Tableau 2 : Classification ATN selon Jack et collègues
(Adapté de Jack et al., 2018)

Selon cette classification, la MA a été définie comme A+T+(N) et se distingue des pathologies présentant des symptômes cliniques similaires mais dont la signature biologique diffère comme les « pathologies suspectées non-Alzheimer » (SNAP de l'anglais « *suspected non-Alzheimer's pathology* »). Ces patients présentent une pathologie tau en l'absence de pathologie amyloïde (A⁻T⁺). Ils correspondent pour la plupart à des cas de vieillissement normal ou sont apparentés à une autre neuropathologie comme la démence frontotemporale (DFT) (Jack et al., 2018). Il est néanmoins estimé que 5% des patients présentant ces SNAP évolueront vers le diagnostic de la MA et ne sont donc pas à exclure totalement (Dubois et al., 2016). Le marqueur de la neurodégénérescence est ici dans cette classification utilisée comme un marqueur de la sévérité de la pathologie et non comme un marqueur discriminant de la MA (Jack et al., 2018). De manière générale, la présence isolée d'une tauopathie (A⁻T⁺) ou d'une amyloïdopathie (A⁺T⁻) est associée à un stade à risque de développer la MA mais ne constitue pas un diagnostic en soi de l'état préclinique. Associées aux altérations cognitives, cette approche AT(N) pourrait donc également être utilisée dans le cadre d'un suivi de sujets présentant des

risques accrus de développement de la MA et ouvre donc la voie à une médecine plus préventive et personnalisée (Scheltens et al., 2021).

3.2. L'état préclinique

La MA et le vieillissement partagent des caractéristiques communes comme l'accumulation d'ENF au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal et transentorhinal, et évoluent parallèlement (Sengoku, 2020). Tout l'enjeu du diagnostic de la MA repose sur la discrimination de l'état préclinique de la MA par rapport à un sujet sain. De plus, cet état s'étend sur de nombreuses années et représente donc un temps non négligeable d'intervention. Les trois meilleurs biomarqueurs en imagerie sont aujourd'hui l'atrophie du lobe temporal médial par examen à l'IRM et l'hypométabolisme cingulaire postérieur et temporopariétale observés par topographie par émission de positon (TEP) avec le traceur ^{18}FDP ($^{18}\text{FDP-TEP}$). L'approche par l'amyloïde-TEP est particulièrement intéressante pour la phase précoce de la MA du fait de sa haute spécificité. Dans ce cas, le diagnostic est essentiellement fondé sur la distribution et l'extension des PA dans le cerveau. Néanmoins certaines variabilités peuvent être observées selon le ligand utilisé, le seuil choisi ou encore selon la région de référence utilisée. L'association de l'amyloïde-TEP à la mesure du niveau d'A β dans le LCR permet à 80-90% de déterminer la pathologie amyloïde (Graff-Radford et al., 2021). La propagation de tau en dehors du lobe temporal médian peut être mesurée à l'aide d'un tau-TEP et permet de discriminer les patients A $^{+}$ T $^{-}$ des patients A $^{+}$ T $^{+}$ constituant donc un marqueur d'intérêt.

Ces marqueurs ne sont pas suffisants pour établir un diagnostic de la forme précoce de la MA mais constituent néanmoins une piste intéressante en permettant l'approfondissement des connaissances scientifiques concernant la progression de la maladie chez l'homme. Par exemple, des études longitudinales menées chez des personnes en bonne santé ont montré que les niveaux de base des biomarqueurs pour l'A β_{1-42} associés ou non à la protéine tau étaient corrélés avec le développement ultérieur d'une MA prodromique (Dubois et al., 2016).

3.3. Émergence de nouveaux biomarqueurs

La recherche s'oriente aujourd'hui sur la découverte de nouveaux marqueurs capables d'améliorer et d'affiner les outils de diagnostics actuels. Ceux-ci s'orientent à la fois sur les pathologies amyloïdes et tau mais aussi sur les autres caractéristiques de la MA comme la neuroinflammation ou la perte synaptique et neuronale. A ce titre, les TEP ciblent des protéines synaptiques comme la protéine de vésicule synaptique 2 (SV2A) qui diminuent de 40% chez les patients atteints de la MA (Zetterberg and Bendlin, 2021). Au niveau du LCR la neurogranine, protéine située au niveau des épines

dendritiques, dont la concentration augmente dans le cas de la MA, apparaît être une bonne candidate (Bjerke and Engelborghs, 2018). D'autres protéines font l'objet d'investigation comme la SNAP25 et synaptotagmine (Galasko et al., 2019).

Le développement de techniques permettant la détection de marqueurs sanguins semble également constituer une approche indispensable à l'établissement d'un diagnostic fiable et rapide. Bien que les résultats pour la pathologie amyloïde semblent contradictoires, ceux obtenus pour la protéine tau sont prometteurs. Ces derniers indiquent une légère augmentation du taux de protéines tau qui corrèle donc avec les observations en CSF (Janeiro et al., 2021). Un autre marqueur sanguin ayant été mis en évidence est celui du niveau de neurofilament léger, composant du cytosquelette axonal, qui augmente chez les personnes souffrant de la MA, corrélant ainsi avec les résultats obtenus dans le LCR (Teunissen et al., 2022).

4. Les marqueurs cellulaires de la maladie d'Alzheimer

4.1. La pathologie Amyloïde β

4.1.1. La protéine précurseur amyloïde APP et son rôle physiologique

Le gène *APP*, situé sur le chromosome 21 chez l'homme, code pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et appartient à une famille regroupant également les gènes *APLP1* et *APLP2*. Ces derniers codent pour des protéines semblables à la protéine APP ou « APP-like » en anglais qui résultent d'une duplication du gène de l'APP au cours de l'évolution. Ces protéines se présentent sous la forme de protéines transmembranaires de classe I. Leur structure est similaire et se compose d'une grande extrémité extracellulaire C-Terminale comprenant 2 ectodomaines, une partie transmembranaire et enfin une courte séquence N-terminale intracellulaire appelé AICD pour « *amyloid intracellular domain* » en anglais comme illustré en Figure 2. L'APP est la seule protéine de cette famille à être capable de produire le peptide A β (Müller et al., 2017).

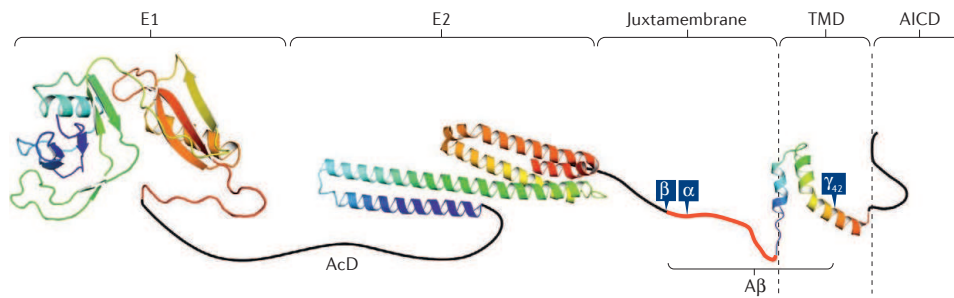


Figure 2 : Structure de la protéine APP₆₉₅

E1 : Ectodomaine 1 ; E2 : Ectodomaine 2 ; AcD : Domaine Acide ; α , β et γ_{42} représentent les sites de clivage des différentes secrétases ; TMD : domaine transmembranaire ; AICD : domaine amyloïde intracellulaire. (D'après Müller et al., 2017)

L'expression de l'APP s'observe très tôt au cours du développement. Chez la souris, elle est détectée dès l'étape de la gastrulation et chez le rat, dès le 9^{ème} jour d'embryogenèse. Pour autant son expression ne semble pas essentielle à la survie des individus puisque des expériences d'inactivation du gène chez le modèle murin ont pu montrer que ces derniers survivent en l'absence d'APP. En revanche, une double inactivation de l'APP et de l'APLP2 compromet leur survie, contrairement à la double inactivation APP et APLP1 (van der Kant and Goldstein, 2015). Les membres de la famille APP présentent des fonctions qui leur sont propres mais partagent également des fonctions communes que ce soit durant le développement, la maturation ou le vieillissement du cerveau (Müller et al., 2017).

Le gène de l'APP comprend 18 exons et est traduit en différentes isoformes dont l'expression diffère selon les tissus. Dans le cerveau, l'isoforme principale est l'APP₆₉₅ qui se différencie par l'absence des exons 7 et 8 (van der Kant and Goldstein, 2015). L'APP est majoritairement exprimé dans les neurones et son expression varie au cours du développement. Son expression augmente progressivement durant la différenciation jusqu'à atteindre un maximum lors de la synaptogenèse puis diminue (Savonenko et al., 2023). L'APP est présent au niveau des axones et des dendrites, à la fois dans les compartiments pré- et postsynaptiques, suggérant également un rôle dans la migration, la croissance axonale et la maturation des neurones, notamment dans la formation et l'intervention des synapses. Son interaction avec des protéines synaptiques comme les SNAREs vient appuyer cette hypothèse. Le rôle de l'APP dans les capacités cognitives a également été mis en évidence notamment au niveau de l'apprentissage et de la mémoire.

4.1.1. Processus de clivage de l'APP

Les fonctions de l'APP sont assurées à la fois par la protéine entière et par les fragments qui résultent de sa protéolyse. La protéine APP est synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique (RE)

et peut alors, soit transiter par l'appareil de Golgi pour rejoindre la membrane plasmique (MP), ou être internalisée par les endosomes. Voir Figure 3. Une fois à la membrane, l'APP peut être soit clivée par l' α -secrétase libérant ainsi le fragment soluble APP α (sAPP α) dans le milieu extracellulaire et le fragment C83, internalisé par endocytose. Cette voie constitue la voie canonique dite non-amyloïde du fait que la protéolyse de l' α -secrétase a lieu dans la séquence du peptide A β empêchant donc sa formation. Le fragment C83 est ensuite clivé par la γ -secrétase séparant ainsi le peptide P3 de l'AICD. La protéine APP peut également être internalisée par endocytose puis clivée dans l'endosome précoce par la protéine β -secrétase 1 (BACE1) libérant ainsi le fragment soluble APP β (sAPP β). Ce fragment est ensuite reconnu par la γ -secrétase qui vient cliver au niveau de différents résidus (38-43, 45-46 ou 48-49) formant ainsi une variété de peptides A β et d'AICD (Müller et al., 2017). Les formes les plus abondantes dans le cerveau sont le peptides A β_{1-40} suivi du peptide A β_{1-42} . Ce mécanisme constitue la voie non-canonique ou amyloïde.

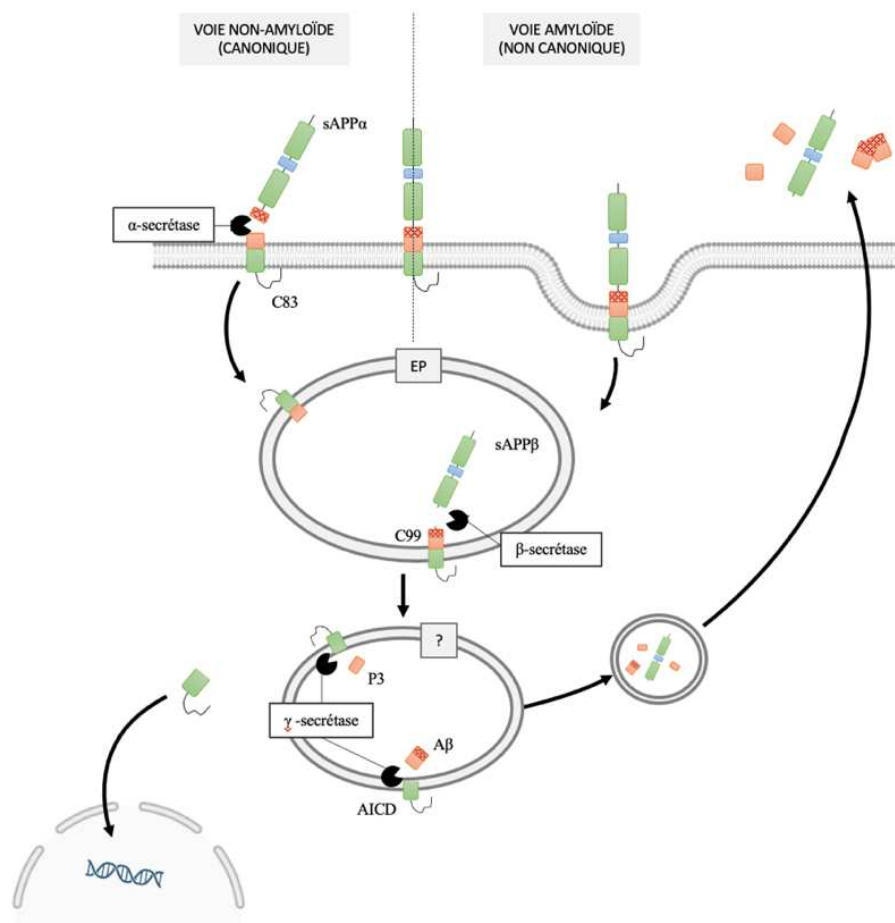


Figure 3 : Représentations des voies de clivages canoniques et non canoniques de l'APP. EP : Endosome précoce, « ? » : localisation indéterminée (Adaptée de van der Kant and Goldstein, 2015)

Bien que la localisation cellulaire des clivages réalisés par l' α -secrétase et BACE1 soit relativement acceptée, celle de la γ -secrétase est encore débattue. Les peptides P3 et A β sont ensuite pris en charge par l'endosome tardif et sont alors acheminés soit vers les endosomes de l'appareil de Golgi ou des exosomes de manière à être libérés dans le milieu extracellulaire ou alors vers le lysosome pour leur dégradation. Une fois exocytés, l'A β quant à lui peut également être recapturé et internalisé dans les neurones, éliminé par le système glial vasculaire et le LCR. Enfin, le domaine AICD est acheminé vers le noyau où il exerce un rôle de régulation de la transcription, notamment de l'APP.

Récemment, 4 nouvelles voies de clivage ont pu être mises en évidence qui sont le produit des ∂ , η et meprine secrétase et de la caspase. Ces réactions peuvent avoir lieu en amont des deux voies de protéolyse décrites précédemment et leurs rôles physiologiques respectifs restent pour l'instant peu connus (Andrew et al., 2016).

4.1.1. Formation des plaques amyloïdes

Les nombreux sites de clivage de la γ secrétase permettent la production de différentes espèces de peptide A β . L'APP est également soumis à des modifications post-traductionnelles (MPT) notamment au niveau de la séquence protéique du peptide A β , qui peuvent de ce fait altérer la stabilité et les propriétés intrinsèques des peptides. Ces MPT peuvent en effet agir sur leur structure et faciliter leur toxicité, leur propagation, ou encore augmenter leur résistance à la dégradation. Ces modifications augmentent considérablement le nombre d'espèces amyloïdes et nombres d'entre elles ont été associées à la MA (Roher et al., 2017). Les espèces A β_{1-40} et A β_{1-42} sont les deux espèces majoritaires. Suite au clivage par la voie amyloïde les espèces A β sont secrétées sous forme de monomères, ceux-ci s'associent pour former des dimères puis des oligomères. L'A β_{1-42} présente une hydrophobicité plus importante que l'A β_{1-40} qui le rend plus propice à l'agrégation (Hampel et al., 2021). Ces derniers s'assemblent sous la forme de protofibrilles dites solubles pour enfin former des fibrilles insolubles qui se présentent sous la forme de feuillet β orientés perpendiculairement (Hampel et al., 2021) comme le montre la figure 4. Les fibrilles représentent 65% des plaques amyloïdes et en sont donc les principales composantes. Les 35% restants sont composés de protéines dites non amyloïdes et incluent entre autres, des glycoprotéines, des glycolipides, des lipides comme le cholestérol, des protéines ou encore des complexes protéolipidiques comme l'apolipoprotéine E (Roher et al., 2017).

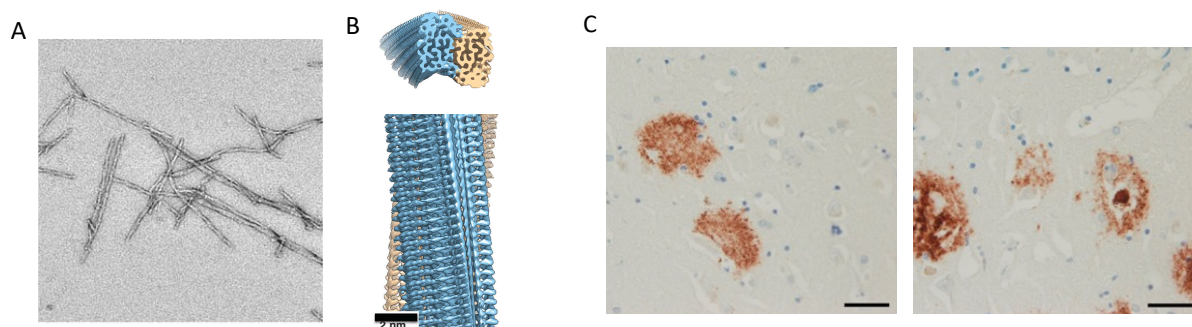


Figure 4 : Illustration des fibrilles $A\beta$ et PA.

A. Illustration de la structure des fibrilles $A\beta$ provenant de cerveau de patient atteint de la MA (D'après Kollmer et al., 2019). B. Reconstitution en 3D des fibrilles (D'après Gremer et al., 2017). C. PA diffuse à gauche et dense à droite (D'après DeTure and Dickson, 2019).

Différentes inclusions ont été mises en évidence chez les patients atteints de la MA selon leur composition, structure et localisation. Ainsi les plaques localisées au niveau des méninges, riches en $A\beta_{40}$ sont à distinguer des plaques parenchymateuses riches en $A\beta_{42}$. Ces dernières peuvent être diffuses ou denses (DeTure and Dickson, 2019). Les plaques diffuses correspondent à un stade plus précoce et sont composées de fibrilles d' $A\beta$ peu condensées. Elles sont retrouvées dans différentes structures cérébrales et se propagent du cortex entorhinal jusqu'au cervelet. Les plaques condensées sont quant à elles retrouvées majoritairement au niveau du cortex et de l'hippocampe et présentent un noyau plus dense. De manière générale, les plaques créent un environnement toxique qui altèrent les fonctions des neurones environnants. Il a par exemple été montré dans un modèle murin que les neurones pyramidaux corticaux et de l'hippocampe présentent une hyperactivité lorsqu'ils se situent à moins de $60\mu\text{m}$ de PA (Busche et al., 2008).

4.1.1. Neurotoxicité de l' $A\beta$ et théorie amyloïde.

Pendant longtemps, la toxicité induite par la pathologie amyloïde s'est focalisée sur les PA et a été à l'origine de la théorie de la cascade amyloïde établie en 1992 par Hardy et Higgins. Celle-ci soutient que la pathologie amyloïde serait l'élément déclencheur de la maladie (Hardy and Higgins, 1992) et est l'une des théories la plus acceptée aujourd'hui. Au cours du temps, la théorie s'est affinée et considère maintenant les oligomères $A\beta$ comme l'espèce la plus neurotoxique et les associe au déclin cognitif (Cline et al., 2018). Depuis lors de nombreux arguments ont appuyé cette hypothèse à savoir le fait que les patients atteints de la MAF et MAs présentent une neuropathologie similaire et que la surexpression d'APP accélère la MA. De plus la proportion de patients présentant une pathologie A^{+T+} est beaucoup plus représentée dans les stades de déficit cognitif légers et modérés que celle A^{+T-} . Les neurones peuvent communiquer entre eux notamment par l'intermédiaire des synapses situées aux niveaux des

épines dendritiques. Ces structures sont hautement dynamiques et leur morphologie change selon leur état d'activité ou de maturité. Ce dernier point est encore débattu. Elles peuvent être classiquement divisées en 4 stades de maturation. Le premier « filopodia » correspond à un stade immature, les suivants incluent selon un gradient de maturité « stubby », « thin » puis « mushroom » (Ghani et al., 2017) comme illustré dans la Figure 5 ci-dessous.

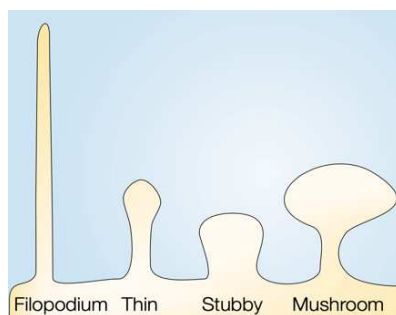


*Figure 5 : Illustration d'une classification morphologique d'épines dendritiques.
(Adaptée de (Hering and Sheng, 2001))*

L'accumulation de l'A β a été associée à une diminution de la densité synaptique et des changements dans leur morphologie. De plus l'A β peut interagir avec de nombreux récepteurs impliqués dans la transmission synaptique dont les récepteurs NMDA et induire une toxicité par la dérégulation de la concentration de calcium dans les neurones (John and Reddy, 2021). Les oligomères A β sont aussi associés à la dysfonction mitochondriale. Observés à la fois chez des patients atteints de la MA et dans les modèles in vivo, ces derniers altèrent la production d'ATP et entraînant une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène « ROS » (Wilkins and Swerdlow, 2017) et donc la mise en place de mécanismes de défense face au stress oxydatif qui en résulte.

4.2. La pathologie tau

4.2.1. La protéine tau

La protéine tau ou protéine associée au microtubules (MT) est codée par le gène *MAPT* situé chez l'homme sur le chromosome 17. L'épissage alternatif dans le SNC permet de générer 6 protéines différentes qui présentent un domaine N-terminal, une partie centrale composée d'un domaine riche en proline (DRP) et de domaines de liaison aux microtubules (DLMT), et enfin, une partie C-terminale comme illustré en Figure 6. La liaison au MT se fait au niveau du DLMT et entraîne un changement dans la conformation de la protéine qui passe d'une forme de trombone à une forme plus linéaire libérant ainsi les extrémités N et C terminales.

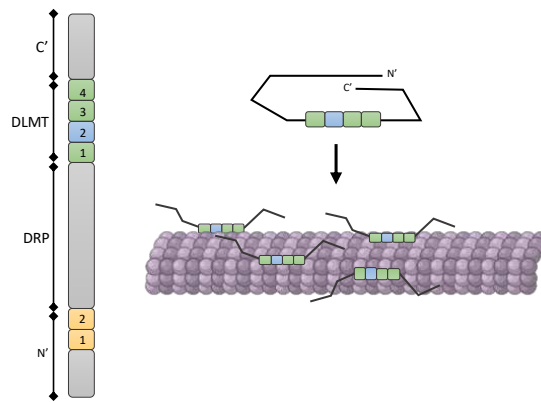


Figure 6 : Illustration de la protéine tau

A gauche, schématisation des différents domaines de la protéine. N' : Extrémité N-terminal ; DRP : domaine riche en proline ; DLMT : Domaine de liaison au MT ; C' : Extrémité C terminale. A droite, représentation du changement de conformation de tau lorsqu'elle se lie au MT. Réalisée à l'aide de Biorender (Adaptée selon de Guo et al., 2017)

Le DLMT peut être composé de 3 (3R) ou de 4 répétitions (4R) selon l'absence ou la présence de la 2^{ème} répétition (2R). La séquence en AA de ces répétitions diffère et leur confère différentes affinités avec les microtubules (MT). Les catégories 3R et 4R comprennent 3 isoformes chacune qui se caractérisent par l'absence (0N) ou la présence d'un (1N) ou deux insertions (2N) au niveau de la région N-terminale. L'expression de ces isoformes varie selon le stade de développement, la région cérébrale ainsi que la maturation et le type neuronal. Ainsi, alors que lors du développement fœtal seuls les isoformes 3R sont exprimés, chez l'adulte les isoformes 3R et 4R sont toutes deux présentes en proportion équivalente. Dans le cerveau, la protéine tau est majoritairement exprimée dans les neurones avec une expression plus faible dans les astrocytes et les oligodendrocytes. Elle se trouve principalement aux niveau des axones mais peut également être retrouvée dans le compartiment somatodendritique, en contact avec la membrane plasmique, dans le noyau ou au niveau des mitochondries indiquant un rôle multiple de la protéine. La protéine tau intervient dans le développement et le maintien du squelette neuronal, dans le transport axonal ou encore dans la plasticité synaptique. Elle participe également à la signalisation cellulaire, et semble pouvoir interagir directement au niveau des brins d'ADN (Guo et al., 2017).

4.2.2. Formation des enchevêtrements neurofibrillaires

L'agrégation de la protéine tau est le résultat de différents processus comme la troncation ou les MPT qui altèrent ses propriétés, sa structure et ses fonctions. L'hyperphosphorylation en est l'une des causes principales. Elle entraîne une diminution de l'affinité des protéines tau pour les microtubules et facilite leur agrégation. Plus de 85 sites de phosphorylation ont été recensés et correspondent dans la

majorité aux résidus sérines et thréonines (Hanger et al., 2009). La phosphorylation de la protéine tau met en jeu plusieurs kinases dont la protéine GSK3- β qui est hyperactivée chez les patient atteint de la MA. Elle colocalise avec les ENF et lorsque son activité est réduite, elle entraine une diminution de la dégénérescence neuronale (Lauretti et al., 2020). Dans le cadre de la MA, les protéines tau hyperphosphorylées s'agrègent en oligomères et s'organisent sous la forme de filaments hélicoïdaux appariés (FHA) ou droits (FD), composants principaux des enchevêtrements neurofibrillaires (ENF) (Fitzpatrick et al., 2017). Les protéines tau tronquées participent également à la formation de ces ENF en recrutant les protéines tau saines environnantes (Guo et al., 2017). Ces filaments illustrés dans la Figure 7 sont présents à la fois dans les neurones et dans la glie. A l'inverse des autres tauopathies, la MA se caractérise par le fait que ses ENF présentent à la fois les isoformes 3R et 4F. Une récente étude utilisant la résonance magnétique nucléaire a montré chez l'homme que les protéines tau 3R et 4R sont recrutées dans les fibrilles à hauteur de 40 et 60% respectivement (Dregni et al., 2022).

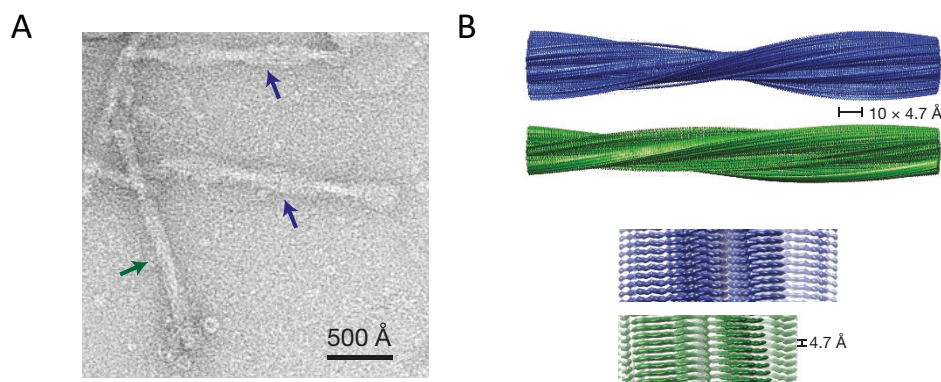


Figure 7 : Illustration des FHA et FD.

A. Illustration des FHA (flèches bleues) et FD (flèches noires) provenant de cerveau Human atteint de la MA observé par microscopie électronique. B. Reconstitution 3D des filaments FHA (bleu) et FD (vert) (Modifié d'après Fitzpatrick et al., 2017).

4.2.3. La théorie tau

Cette théorie place tau comme élément initiateur de la pathologie. La protéine tau est associée au déclin cognitif et à la mort cellulaire. L'un des arguments en faveur de cette théorie est que la pathologie tau serait présente en amont de la pathologie amyloïde (Arnsten et al., 2021) et corrèle par la suite d'autant plus avec les déficits cognitifs et la neurodégénérescence que la pathologie A β . Le mécanisme par lequel tau se propage entre les cellules n'est pas encore clairement défini. Une des hypothèses les plus probables est celle du prion ou « prion-like » en anglais du fait que la présence d'agrégats de tau dans le milieu extracellulaire permettait d'induire et de propager la pathologie dans

les régions cérébrales avoisinantes. Toutefois l'absence de mutations dans le gène *MAPT* n'est pas liée à une quelconque forme de la MA et laisse penser que la pathophysiologie tau serait en aval de la pathologie A β .

4.3. La Neuroinflammation

La neuroinflammation s'inscrit également en tant que marqueur de la MA. Elle se manifeste par le recrutement des astrocytes et de la microglie (gliose).

4.3.1. Microglie et MA

La microglie est un ensemble de cellules gliales, macrophages résidents du SNC. Ces cellules interviennent dans le maintien de l'homéostasie cérébrale et dans la surveillance immunitaire. La microglie joue également un rôle dans la plasticité synaptique notamment par son activité phagocytaire et dans la mort neuronale (Bohlen et al., 2019). L'activation de la microglie ou gliose chez l'adulte peut donner lieu à différentes réponses qui se traduisent notamment par une activité pro (M1) ou anti-inflammatoire (M2) (Savonenko et al., 2023). Au cours du vieillissement, la morphologie microgliale peut être altérée. Les prolongements microgliaux sont plus courts réduisant ainsi leur capacité de surveillance. La microglie devient également plus propice à conserver un état activé qui se traduit par la stimulation de son activité d'élagage des synapses et se répercute donc sur l'activité synaptique neuronale (Leng and Edison, 2021).

La microglie peut être activée à la fois par le peptide A β et la protéine tau. Il a récemment été montré que l'état d'activation « DAM » spécifiquement associé à la neurodégénérescence, se retrouve également dans la MA. Cet état s'acquiert en deux étapes et fait intervenir les récepteurs TREM2, un récepteur de surface cellulaire (Savonenko et al., 2023). La microglie dispose d'un grand nombre de récepteurs interagissant avec l'A β (Merlo et al., 2020).

Celle-ci a un rôle important dans la progression de la maladie puisqu'elle participe à l'élimination de l'A β . Au stade précoce, la gliose apporterait un effet bénéfique en phagocytant les espèces A β et en libérant des facteurs neurotrophiques dans le milieu extracellulaire. Parallèlement, la microglie activée favoriserait l'inflammation chronique par la libération de molécules pro-inflammatoires comme les cytokines (Kloske and Wilcock, 2020). Certaines d'entre elles vont en revanche diminuer l'activité phagocytaire favorisant ainsi l'accumulation d'A β . La relation entre tau et la microglie n'est toujours pas très clairement établie. Néanmoins, il est décrit que la microglie participe à l'élimination de tau tout en favorisant la formation des agrégats par la libération de cytokine activatrice

de la tyrosine kinase impliquée dans sa phosphorylation. Tau impacterait également la morphologie microgliale diminuant ainsi sa capacité d'« immunosurveillance ».

4.3.2. Astrocytes et MA

Les astrocytes constituent la population de cellules gliales la plus abondante au sein du SNC. Leur rôle est multiple. Les astrocytes assurent entre autres l'homéostasie ionique, la recapture de neurotransmetteur et interviennent dans la formation, le métabolisme et la transmission synaptiques (Verkerke et al., 2021). Les astrocytes forment la barrière fonctionnelle du SNC et limitent de ce fait l'entrée des cellules du système immunitaire. En cas d'inflammation, les astrocytes entreprennent comme la microglie des changements conformationnels et arborent un phénotype hypertrophique caractéristique de la forme activée qui peut être de 2 types : A1 et A2. Les astrocytes A1 sont considérés comme toxiques pour le SNC et sont retrouvés abondamment chez les patients souffrants de la MA (Leng and Edison, 2021).

Les astrocytes participent également à la réponse inflammatoire de la MA et ce dès les stades précoces. Les astrocytes contribuent à la pathologie de 2 manières : La première est la production d'espèces pro-inflammatoires et la production de ROS. La deuxième est liée à la capacité des astrocytes à éliminer l'A β du SNC grâce à ses échanges avec l'espace périvasculaire le long de la barrière hémato-encéphalique (Arranz and De Strooper, 2019). L'altération des fonctions astrocytaires entraînent une diminution de l'élimination de l'A β . De plus les astrocytes constituent la réserve énergétique et assurent la nutrition neuronale. Lorsque leur fonction est altérée, elle compromet également avec la délivrance de nutriments nécessaire au maintien des réseaux neuronaux altérant donc leur fonctionnement.

5. Les facteurs de risques, Prévention et Traitement

Comme mentionné plus haut, l'étiologie de la MAs reste toujours inconnue à ce jour. Malgré le fait qu'elle ne soit pas associée à des mutations causales comme la MAf, 60 à 80% des cas peuvent toutefois être associés à des facteurs de risques génétiques. L'âge et le genre féminin sont également les facteurs de risques les plus favorables au développement de la MA (Scheltens et al., 2021). L'âge constitue le principal facteur de risque de la MA pour l'ensemble des raisons citées dans le chapitre précédent. Il entraîne des altérations cellulaires et diminue les capacités de réparation favorisant ainsi l'apparition de maladie. Ainsi, la prévalence de la MA est estimée à 30-35% chez les personnes dans la tranche d'âge 75-84 ans et de 50% chez les personnes au-delà (A. Armstrong, 2019).

Le développement des études d'association pangénomique ou GWAS pour « *Genome-wide association study* » a permis de mettre en évidence un certain nombre de gènes pouvant favoriser ou ralentir le développement de la MA. Ces gènes sont impliqués dans des processus physiologiques variés comme la réponse inflammatoire, l'endocytose ou le métabolisme lipidique. Deux d'entre eux ressortent particulièrement : le gène *APOE* et le gène *TREM2* tous deux impliqués dans la réponse inflammatoire dans la MA (Scheltens et al., 2021).

Ainsi Le gène *APOE* représente aujourd'hui le facteur de risque le plus établis dans la MA après le vieillissement. Ce gène code pour une protéine du même nom qui est principalement synthétisée par les astrocytes et à moindre mesure par la microglie en conditions physiologiques. La protéine *APOE* est impliquée dans le transport des lipides dont le cholestérol et les phospholipides. Elle est directement corrélée à la pathologie amyloïde puisqu'elle fait partie des espèces non amyloïdes composant les plaques et interagit directement avec les oligomères A β (Kloske and Wilcock, 2020). Des études transcriptomiques ont également pu établir un lien étroit entre les variants du gène *APOE* et l'activité microgliale dont l'activité pro-inflammatoire et phagocytaire serait influencée par la présence des différents allèles du gène (Serrano-Pozo et al., 2021). Le gène présente 3 variants : $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. Alors que le variant $\epsilon 2$ est associé à un effet protecteur, les individus porteurs de l'allèle *APOE* $\epsilon 4$ présentent un risque accru de développer la pathologie et ce, de manière plus précoce, d'autant plus s'ils présentent une forme homozygote (Neu et al., 2017). Il a également été montré que la protéine *APOE* est capable d'activer la voie de signalisation de *TREM2*, récepteur exprimé par la microglie mais aussi par les macrophages (Guo et al., 2020). Selon les variants les personnes peuvent présenter un risque 2 à 8 fois plus important de développer la MA (Scheltens et al., 2021). *TREM2* participe à l'état d'activation DAM et peut interagir avec l'A β de manière à l'internaliser et le dégrader. Les mutations ou variants de ces gènes peuvent donc altérer les mécanismes d'élimination d'A β et favoriser la MA (Zhao et al., 2018).

Un article publié en 2020 dans le journal *The Lancet* met en avant douze facteurs de risque modifiables de la MA à savoir : un faible niveau d'éducation, l'hypertension, la perte d'audition, l'obésité, la dépression, l'absence d'activité physique, le diabète, l'isolement social, la consommation excessive de tabac et d'alcool et la pollution. La prise en compte de ces différents facteurs pourrait prévenir ou retarder l'apparition des symptômes de démence jusqu'à 40%. Selon cette étude, cela permettrait de réduire l'inflammation et les dommages vasculaires, de maintenir ou d'augmenter les capacités cognitives et diminuer les altérations neuropathologiques (Livingston et al., 2020).

6. Traitement et stratégie thérapeutique

Les traitements pharmacologiques ne permettent pas encore de traiter la maladie mais réduisent les symptômes. La majorité des traitements utilisés visent à diminuer les symptômes en jouant sur le système cholinergique. Ce dernier est impliqué dans la régulation de nombreux processus cognitifs comme l'attention et est impacté au cours de la MA. Les patients atteints de troubles cognitifs légers ou modérés se voient donc prescrire du Donepezil, de la Rivastigmine ou la Galantamine, des inhibiteurs réversibles de l'acétylcholine estérase. La Mémantine est un antagoniste des récepteurs NMDA ayant fait ses preuves dans l'amélioration de la cognition et peut être prescrit seul ou en complément du Donepezil au patient en phase de démence modérée ou sévère (Alz.org). Aux Etats-Unis, grâce à un système d'évaluation rapide qui s'applique aux maladies disposant de peu de traitement, 2 nouveaux médicaments ont pu être autorisés sur le marché. Il s'agit des anticorps monoclonaux Aducanumab (2021) et Lecanemab (2023) (FDA.gov). Ces deux drogues visent à réduire les espèces A β et les plaques amyloïdes et sont associées à un ralentissement du déclin cognitif. L'Europe n'a quant à elle, pas accordé sa confiance à l'Aducanumab et la demande d'autorisation de mise sur le marché européen a été refusée. La demande d'autorisation pour le Lecanemab est en cours. Depuis 2016, la haute autorité française a supprimé le remboursement par le système de soin des médicaments prescrit pour la MA à la suite d'une réévaluation de leur efficacité (has-sante.fr). Ceci illustre le besoin urgent de nouveau traitement pour les patients souffrant de la MA.

La prévention reste la meilleure piste actuelle pour retarder ou diminuer le déclin cognitif. Cette approche constitue un intérêt majeur puisqu'elle permet d'agir en amont du stade prodromique, notamment chez les patients à risque. En 2019, l'OMS publie des lignes directrices et des recommandations visant à établir une base de connaissance pour les différents acteurs politiques et de la santé dans le but de réduire les facteurs de risque de la MA et de la démence en générales. Elles incluent des recommandations comme l'exercice physique, l'adoption d'un régime sain de type méditerranéen ou encore l'intervention des organismes de santé sur la consommation et l'addiction aux drogues comme le tabac et l'alcool.

En 2022, Cummings et ses collègues recensent 143 médicaments en phase clinique dirigés contre la MA (30 en Phase I, 82 en Phase II et 31 en Phase III) dont 40% mettent en jeu des médicaments déjà présent sur le marché. Plus de 80% d'entre eux visent à ralentir ou diminuer l'avancée de la pathologie (Cummings et al., 2022). Ces données témoignent de la mobilisation mondiale contre la MA. Les approches thérapeutiques actuelles sont majoritairement orientées sur l'A β . Il s'agit de la seule catégorie qui présente aujourd'hui des candidats vaccins, le reste étant basé sur l'utilisation de

médicaments plus classiques ou d'anticorps monoclonaux. Ces derniers constituent la piste la plus prometteuse comme le Solanezumab qui cible la partie centrale de l'A β pour améliorer son élimination. Il constitue un candidat sérieux pour les phases asymptomatiques et prodromique précoce de la MA (Song et al., 2022). La pathologie tau, la neuroinflammation, la plasticité synaptique et la neuroprotection ou le métabolisme constituent une liste non exhaustive des différentes cibles thérapeutiques actuellement à l'essai. Un effort est également fait sur le développement de médicament visant les symptômes neuropsychiatriques comme les insomnies ou l'agitation (Scheltens et al., 2021).

Ce chapitre a pu mettre en évidence la complexité de la MA. Ses différentes formes, bien que similaires cognitivement, présentent également des disparités physiologiques dont la compréhension semble essentielle à la mise en place d'une approche thérapeutique adaptée. Ceci nécessite le développement de modèles de la MA qui sont pour l'instant essentiellement basés sur la MAf. Ils feront l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE 3 : MODELISER LA MA

Les progrès technologiques ont permis des avancées majeures dans l'élaboration de modèles expérimentaux de la MA. Néanmoins, l'absence de traitements curatifs et symptomatiques efficaces soulève souvent la question de la transposabilité de ces modèles et met en avant leurs limitations. Les modèles sont essentiels à la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans la MA et permettent la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Ils seront séparés ici en deux catégories : la première est l'approche *in vitro* pouvant être menée en 2 ou 3 dimensions (2D ou 3D), la deuxième consiste en une approche *in vivo* basée sur l'utilisation de modèle animaux.

1. Les modèles *in vitro*

Les modèles *in vitro* de la MA se basent essentiellement sur la différenciation de cellules souches embryonnaires (ESC) ou de cellules pluripotentes induites (iPSC) en différents types de cellules du SNC.

1.1. Introduction au neurodéveloppement

1.1.1. Mise en place du système nerveux central

L'approche *in vitro* nécessite une certaine compréhension des mécanismes sous-jacents au développement cérébral. La neurogénèse se met très tôt en place chez les vertébrés.

Au moment de la gastrulation (E14-E15 chez l'homme), l'embryon passe d'une organisation en monocouche de cellules pluripotentes, à une organisation en 3 couches ou feuillets de cellules multipotentes : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Les cellules du mésoderme s'invaginent et forment la corde dorsale ou notochorde, principal axe de symétrie de l'organisme. Suite à la libération des signaux inducteurs de la notochorde, l'ectoderme situé au-dessus se spécialise pour former le neuroectoderme puis la plaque neurale. Les côtés latéraux ou alaires de la plaque neurale se replient ensuite pour former un tube polarisé, le tube neural qui est à l'origine de la totalité du SNC. A la suite de ce processus, les cellules se spécialisent et s'organisent selon un axe dorsoventral pour former la plaque du plancher, les cellules du tube neural (au centre), la plaque du toit et les crêtes neurales. Les cellules souches (CS) du tube neural sont à l'origine du cerveau et de la moelle épinière et sont encore caractérisées à ce stade de CS multipotentes puisqu'elles peuvent générer des neurones ou des cellules gliales. Sous l'effet de processus morphogénétiques, les différentes subdivisions du cerveau se mettent en place pour former le télencéphale à l'origine des aires corticales, de l'hippocampe et des ganglions

de la base, le diencéphale qui donnera entre autres le thalamus, l'hypothalamus et les nerfs optiques, le cervelet et le bulbe issu du métencéphale et myélencéphale respectivement. Le développement de telles structures est possible grâce l'instauration d'identité et de diversités cellulaires. Ces dernières sont le résultat d'un contrôle spatial et temporel par un ensemble de gènes couplés à des signaux cellulaires libérées par les cellules embryonnaires environnantes (Neuroscience 6^{ème} édition, DeBoeck).

1.1.2. Neurogénèse, différenciation et migration neuronale

L'identité corticale dépend de plusieurs voies de signalisation qui incluent entre autres les voies des protéines morphogénétiques de l'os (BMP), Wnt et Sonic Hedgehog (Shh). Les voies BMP et Wnt sont les premières à intervenir puisque leur inhibition est nécessaire pour l'acquisition de l'identité neurale. Ensuite, au fur et à mesure du développement, différents gradients d'expression de ces protéines se mettent en place et viennent déterminer les axes rostrocaudal et dorsoventral du SNC comme illustré dans la Figure 8 ci-dessous.

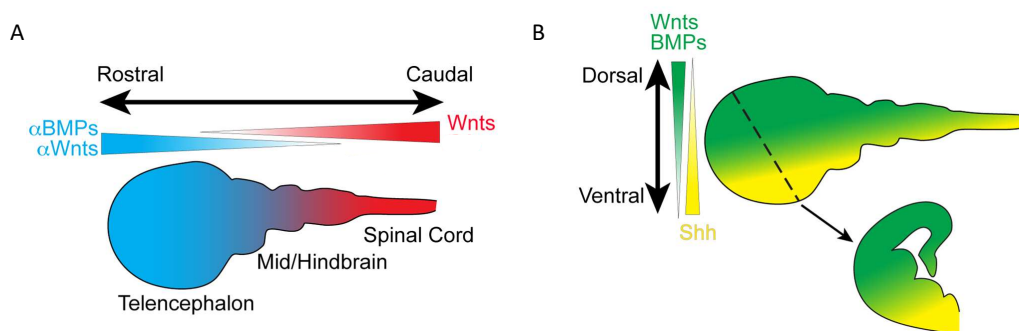


Figure 8 : Gradients morphogénétiques impliqués dans la régionalisation du SNC.

A. Représentation des gradients des voies BMP et Wnt selon l'axe rostrocaudal. B. Représentation des gradients des voies BMP et Shh selon l'axe dorsoventral (Adaptée de Petros et al., 2011).

Selon l'exposition à ces molécules, deux types de neurones corticaux peuvent être obtenus. Les neurones pyramidaux issus de la partie dorsale du télencéphale correspondant à plus de 85% des neurones corticaux, et les neurones inhibiteurs provenant des éminences ganglionnaires dans la partie ventrale (Van Den Ameele et al., 2014).

Le développement du cortex cérébral se met en place à partir de pool de cellules souches neuro-épithéliales qui se différencient en cellules de la glie radiaire (GR). Ces cellules souches neurales (CSN) sont capables d'entreprendre des divisions symétriques ou asymétriques qui permettent à la fois d'expandre le nombre de cellules progénitrices et de générer des neurones excitateurs ainsi que des

cellules gliales. Les GR forment dans un premier temps la zone ventriculaire (VZ) composée de cellules GR apicales (aGR) et subapicales (saGR) puis la SVZ composée de cellules de GR basales (bGR) et de progéniteurs basaux (PB) produit de la duplication asymétrique des aGR (Villalba et al., 2021). Selon leur origine les neurones immatures produits par la GR vont ensuite migrer le long de la glie radiaire (origine dorsale) ou de manière tangentielle suivant la SVZ (origine ventrale) pour rejoindre leur région d'appartenance. La formation des 6 différentes couches du cortex se fait selon un gradient inversé commençant par la mise en place de la couche VI la plus profonde et finissant par la couche I et se met donc en place selon une certaine temporalité (Villalba et al., 2021).

L'ensemble de ces processus engendre une multitude de cellules progénitrices neurales (NPC) qui peuvent être catégorisées selon leur distribution, leur morphologie, leur fonction, leur activité ou encore leurs caractéristiques moléculaires. L'essor du séquençage transcriptomique a permis une meilleure compréhension des différents types cellulaires qui composent le cerveau humain au cours du développement, du stade embryonnaire au stade adulte (Darmanis et al., 2015).

Les avancées dans le domaine de la culture cellulaire ont permis, notamment grâce à ces connaissances, le développement de nombreux protocoles de différenciation multipliant le nombre possible de modèles d'études de pathologies dont celui de la MA.

1.2. Modéliser la MA

1.2.1. ESC et iPSC

Les CS sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement par division cellulaire et à leur potence. Les cellules souches embryonnaires (ESC) sont issues de la masse interne du blastocyste et sont encore à ce stade, pluripotentes (Inserm). L'une des principales limites éthiques à leur utilisation chez l'homme est leur origine, puisque celles-ci proviennent directement d'embryons. La découverte par Yamanaka et son équipe en 2006 qui lui a valu le prix Nobel en 2012, a rendu possible la reprogrammation de fibroblastes de souris iPSC par l'utilisation d'un cocktail de 4 facteurs de transcription : Oct4 (Octamer-binding transcription factor), SOX2 (sex-determining region Y-box 2), KLF4 (Kruppel-like factor 4) et enfin le proto-oncogène c-Myc, vient contourner cette limitation. Depuis, les iPSC sont devenues un outil très populaire et l'origine des tissus dont elles sont issues s'est largement diversifiée incluant entre autres des cellules hématopoïétiques ou des kératinocytes (Scesa et al., 2021).

La majorité des protocoles de différenciation sont initiés directement à partir du stade ESC ou IPSC vers le type cellulaire recherché. Il est également possible de dériver des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes à partir du stade intermédiaire NPC (Boissart et al., 2013; Chen et al., 2015; Lepski et al., 2013). Au cours de ma thèse je me suis essentiellement intéressée aux neurones corticaux des couches supérieures I-III du cortex. L'obtention de ces neurones s'appuie sur la double inhibition de la voie SMAD (inhibition des voies BMP et de la famille TGF- β dont BMP fait partie) (Chambers et al., 2009), suivi d'un passage par la formation de structures en 3 dimensions appelées corps embryoïdes (EB), d'une exposition au facteur de croissance FGF2, puis d'une sélection physique ou enzymatique des NPC.

La culture en 2D peut être réalisée en monoculture ou combiner différents types cellulaires permettant ainsi d'explorer leurs interactions et leurs contributions respectives dans la MA. Les plus couramment utilisées associent des neurones à des astrocytes ou à la microglie (Barak et al., 2022). Ces approches peuvent tout de même présenter certaines limitations comme le manque de diversité cellulaire ou la contrainte physique exercée par la matrice qui limite les interactions entre les cellules. Les modèles en 3D tentent alors de dépasser ces obstacles en permettant aux cellules de s'organiser spatialement. Les sphéroïdes sont à distinguer des organoïdes par le fait qu'elles se présentent comme une structure en 3D composée d'un ou plusieurs types cellulaires et dont les capacités d'auto-organisation sont limitées (Paşca et al., 2022). À l'inverse, les organoïdes comprennent une grande diversité de types cellulaires et sont capables de former des structures autoorganisées capables de reproduire certaines architectures du cerveau humain en suivant son organisation spatio-temporelle au cours du développement (Barak et al., 2022; Paşca et al., 2022). Les organoïdes peuvent être générés de deux façons. Ils peuvent être guidés par l'ajout de petites molécules vers la formation d'une structure d'intérêt ou à l'inverse poussés dans une différenciation « par défaut ». Ces derniers sont dits non guidés et présenteront par définition une plus grande diversité cellulaire. Il est également possible d'assembler plusieurs de ces structures 3D entre elles pour former des assembloïdes permettant ainsi d'étudier des interactions cellulaires spécifiques selon les types cellulaires associés (Birey et al., 2017). Les différentes approches utilisées pour modéliser la MA *in vitro* sont illustrées dans la Figure 10.

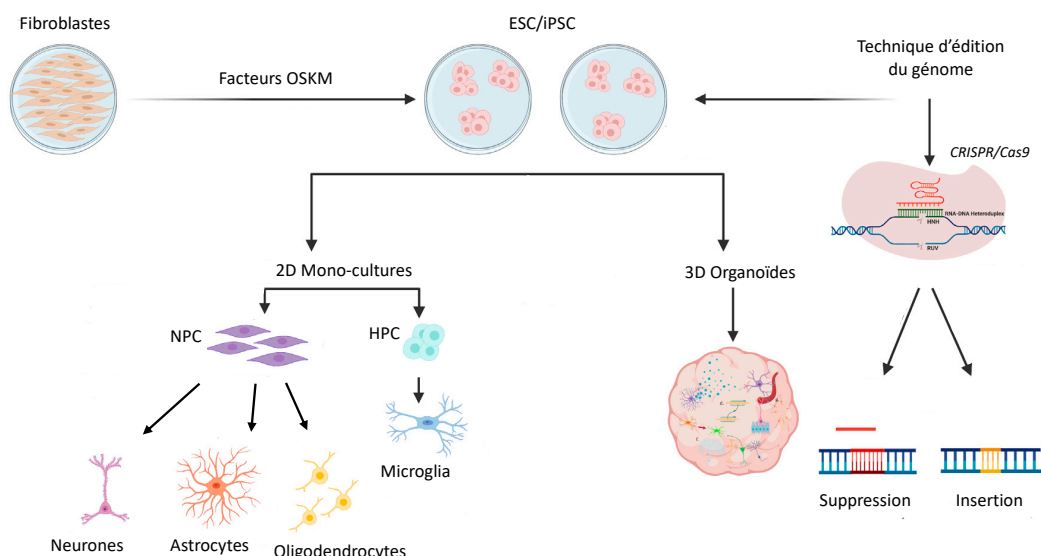


Figure 10 : Illustration des différents types de cultures cellulaires pour l'étude de la MA.
(Adaptée de Whiteley et al., 2022)

Alors que les études post-mortem permettent d'avoir une meilleure idée des altérations cellulaires et moléculaires développées au cours de la MA, les cultures d'ESC et d'iPSC permettent, quant à elles, de mieux comprendre les mécanismes qui initient et participent à la progression de la MA à partir de cellules humaines. L'obtention des iPSC à partir de cellules de patients atteints de la MAf ou MAs, ou d'individus sains leur confère un certain avantage par rapport aux cellules ESC. En effet, la génétique joue un rôle prépondérant dans le déclenchement et la progression de la MA qu'elle soit sporadique ou familiale (Bellenguez, 2022). Il a par ailleurs été montré que la dérivation de cellules iPSC de patients MAf et MAs permettait de reproduire des phénotypes de la MA comme l'accumulation d'A β ou de p-tau de manière spécifique suggérant que les caractéristiques relatives à l'étiologie de la maladie semblent pouvoir également être conservées (Ochalek et al., 2017). Un autre aspect intéressant de ce modèle est qu'il permet l'étude de la MA à des stades plus précoces de différenciation permettant d'apporter de nouvelles connaissances sur les possibles mécanismes pouvant être à l'origine ou favoriser son développement. Il a ainsi pu être montré que les NPC dérivés d'iPSC mutées dans le gène PSEN1 (MAf) présentent déjà à ce stade une accumulation d'A β et une altération du ratio A β_{1-40} /A β_{1-42} (Sproul et al., 2014). Bien que la grande majorité des modèles de la MA se focalise sur les neurones, de plus en plus de modèles se développent autour des autres types cellulaires impliqués, à savoir les astrocytes et la microglie. De plus, l'établissement de lignées isogéniques, grâce aux nouvelles techniques d'édition du génome, favorise l'étude des mutations et des facteurs de risque de la MA dans un contexte génétique humain identique et permet donc de s'affranchir de toute autre influence sur le paramètre que l'on cherche à étudier.

Comme décrit précédemment, les modèles 3D apportent une dimension supplémentaire dans l'étude de la MA en permettant de mieux comprendre les interactions intercellulaires, notamment entre les neurones et les cellules gliales. Zhao et collègues ont par exemple démontré à l'aide d'organoïdes dérivés de patient MAS et d'individus sains porteurs ou non de la forme APOE $\epsilon 4$, que celle-ci entraînait une aggravation de la dégénérescence des neurones. Ils ont également été en mesure d'observer entre autres une accumulation des espèces $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ dans les organoïdes dérivés de patients MAS, mais une accumulation de p-tau, celle-ci étant également dépendante de l'allèle APOE $\epsilon 4$ (Zhao et al., 2020). Les organoïdes permettent également d'étudier les altérations fonctionnelles de la MA. Il a par exemple été démontré que les organoïdes dérivés d'iPSC de patients MAf présentent déjà à ce stade une altération de la balance inhibition/excitation, caractéristique de la MA (Ghatak et al., 2019).

Dans leur revue publiée en 2022, Barak et ses collègues ont synthétisé dans la Figure 11 ci-dessous, une liste non exhaustive des principales avancées obtenues grâce à l'utilisation de modèles in vitro de la MA.

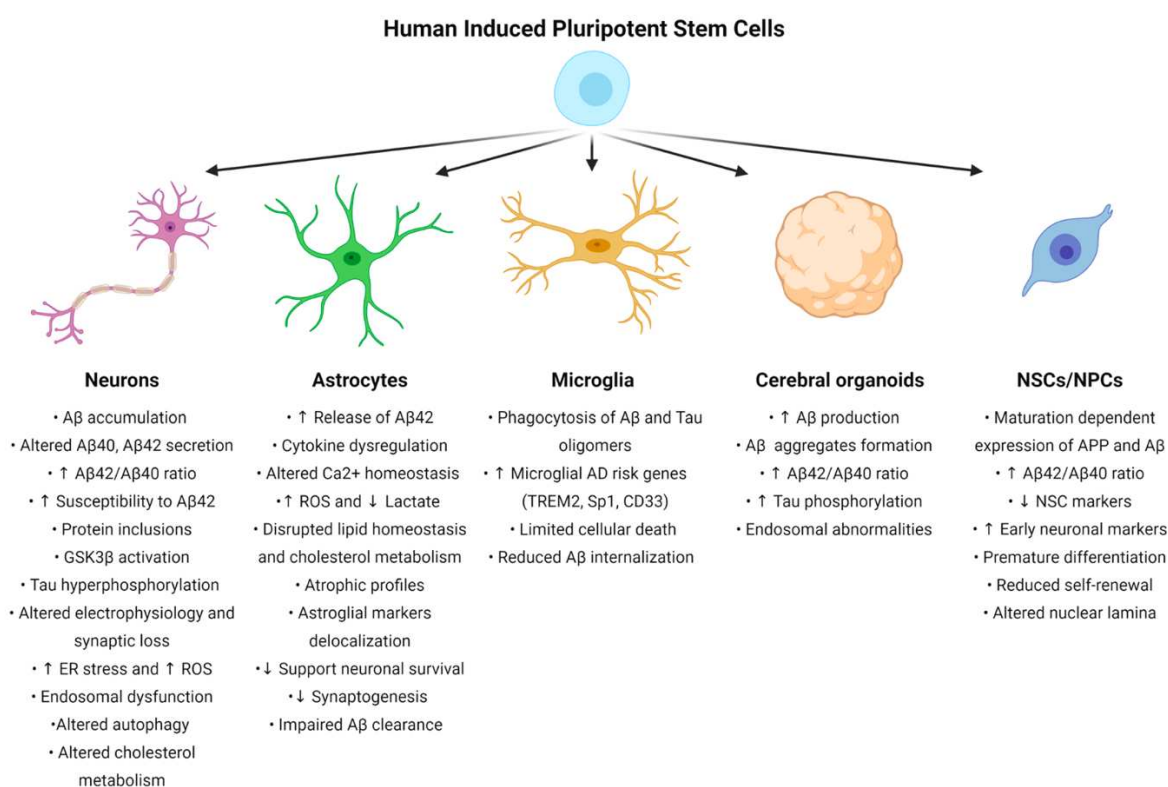


*Figure 11 : Listes non exhaustive des avancées sur la MA à l'aide de modèle in vitro.
(D'après Barak et al., 2022)*

2. Les modèles in vivo

Les modèles animaux sont des outils puissants dans l'étude des mécanismes de la MA mais aussi dans la mise en évidence de cibles thérapeutiques (Sanchez-Varo et al., 2022). Bien que les modèles in vivo pour la MA incluent des insectes comme la drosophile (Tsuda and Lim, 2018) ou des poissons comme le Zebrafish (Saleem and Kannan, 2018), la grande majorité d'entre eux utilise des modèles de rongeurs. Ces derniers sont particulièrement intéressants car ils peuvent être facilement manipulés génétiquement et présentent un cycle de reproduction relativement court. Un bon modèle doit être capable de reproduire des marqueurs de la MA couvrant les aspects synaptiques, fonctionnels et comportementaux. D'un point de vue expérimental, il doit être reproductible et les symptômes doivent s'exprimer dans un court laps de temps (Götz et al., 2018).

2.1. Les souris transgéniques (Tg)

Le nombre de modèles de rongeur pour la MA est en constante expansion et l'on recense aujourd'hui 214 modèles, dont les souris représentent plus de 85% (Alzforum.org). En conditions physiologiques, c'est-à-dire en l'absence de mutation génétique, les souris ne développent pas les symptômes caractéristiques de la MA. Bien qu'elles présentent des similarités avec l'homme du fait notamment de son appartenance à la classe des mammifères, les souris présentent des différences notamment au niveau des protéines impliquées dans la MA. L'homme et la souris partagent 96% d'homologie concernant la séquence protéique de l'APP mais la présence de seulement 3 nucléotides différents dans la séquence du peptide A β , suffit à diminuer ses capacités à s'agréger (Sanchez-Varo et al., 2022). Pour reproduire les processus observés au cours de la MA chez l'homme il faut donc modifier génétiquement les souris en apportant par exemple, de façon exogène, le gène humain (Drummond and Wisniewski, 2017). Des mutations liées à la MAf insérées de manière inductible dans la séquence de l'A β murin ont néanmoins permis de reproduire le dépôt de PA démontrant ainsi que l'A β murin est capable d'acquérir cette capacité d'agrégation observable chez l'homme (Xu et al., 2015). Concernant la protéine tau, celle-ci n'est présente chez la souris que sous l'isoforme 3R (Götz et al., 2018). Or, comme précisé dans le chapitre précédent, chez l'homme, les ENF sont composés à la fois des isoformes 3R et 4R en proportions presque identiques. La MA se traduit également par des atteintes cognitives et comportementales, qui peuvent être étudiées chez la souris (Forner et al., 2021). Il a par exemple été montré que les souris 5xFAD porteuses de 5 mutations dans les gènes de l'APP et de la PSEN1 montrent une altération de leurs comportements sociaux (Locci et al., 2021).

Les premières souris transgéniques sont apparues dans les années 1990 et se basent sur l'insertion aléatoire dans le génome de la souris, d'ADNc humains codant pour des protéines initialement associées à la MAf, et permettent soit de surproduire l'Aβ dans le cas de l'utilisation du gène portant les mutations de l'APP humaine, ou d'altérer le métabolisme de l'APP murin lorsque les mutations PSEN1 et PSEN2 sont introduites (Götz et al., 2018). Ces dernières, à elles seules, ne permettent pas la production de plaques amyloïdes et nécessitent d'être couplées au transgène de l'APP humaine pour les observer (Sanchez-Varo et al., 2022). Bien que la combinaison de ces différents transgènes permette alors de reproduire, dans une moindre mesure et de manière plus prononcée, la pathologie Aβ y compris les déficits cognitifs, elle ne permet pas de reproduire l'hyperphosphorylation de la protéine tau ni les ENF. Des modèles basés sur l'utilisation de transgènes mutés dans le gène *MAPT* codant pour la protéine tau ont alors été utilisés et combinés aux transgènes associés à la pathologie amyloïde.

Ces modèles présentent une grande variabilité notamment causée par la diversité des mutations pouvant être utilisées pour modéliser la MA. L'insertion aléatoire des transgènes dans le génome murin complique l'interprétation des résultats puisque ces derniers peuvent entraîner des altérations non souhaitées dites « off target ». Les promoteurs utilisés pour contrôler l'expression des transgènes peuvent également induire des variations d'expression importantes selon les modèles (Drummond and Wisniewski, 2017).

Pour tenter de palier à ces observations, une deuxième génération de souris Tg a alors été développée en tirant profit de l'utilisation des techniques d'édition du génome (Sanchez-Varo et al., 2022) permettant ainsi l'insertion (KI pour « *Knock in* » en anglais) ciblée des gènes d'intérêt. Par exemple, l'insertion des formes humaines de l'APP, modifiée ou non, (Baglietto-Vargas et al., 2021) a permis l'étude de l'amyloïdopathie dans des conditions physiologiques puisque son insertion dans le génome est mieux contrôlée. Ces modèles sont caractérisés par une surproduction d'Aβ, de dépôts de plaques amyloïdes dont la composition est plus similaire de celle observée chez l'homme, mais aussi par l'apparition de déficits cognitifs et l'altération la plasticité synaptique. (Sanchez-Varo et al., 2022). Cette approche a également permis des avancées dans la compréhension de la pathologie tau notamment par la création de modèle KI exprimant la totalité de la séquence protéique humaine. Ceci permet alors l'expression des 6 isoformes (3x3R et 3x4R) humaines dans un contexte physiologique et permet ainsi une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à la tauopathie (Saito et al., 2019).

L'existence des modèles d'amyloïdopathie et de tauopathie indépendants permet d'étudier la contribution de nouveaux marqueurs plus fonctionnels de la MA comme l'altération synaptique (Sanchez-Varo et al., 2021). L'étude de la neurodégénérescence est par exemple, particulièrement

associée à la pathologie tau, bien que des modèles conduisant à l'accumulation intra-neuronale d'A β puissent également l'observer. L'association des deux modèles MAF et MAPT permet de mieux étudier ce phénomène (Sanchez-Varo et al., 2022). La recherche actuelle accentue également ses efforts pour tenter de reproduire la MA dont l'étiologie n'est pas complètement connue. L'arrivée des GWAS et la mise en évidence de facteurs de risque ont permis le développement d'une nouvelle génération de modèles de souris transgéniques qui tente de répliquer les mécanismes sous-jacents de la MA en jouant sur des mutations et variants génétiques comme les gènes APOE ou TREM2 (Liu et al., 2017; Song et al., 2018). Par ailleurs, l'étude de l'interaction astrocytes-microglie est également rendue possible dans un contexte MA in vivo grâce à ces modèles.

Les modèles murins transgéniques permettent l'étude de la MA dans un contexte immunocompétent et de suivre l'évolution de la maladie au cours du vieillissement, ce qui est impossible in vitro même dans le cas des culture 3D (Papaspypopoulos et al., 2020). Toutefois, ces modèles ne permettent pas encore de comprendre complètement l'étiologie de la MA. Ceci s'explique en partie par la présence de biais comme la combinaison de mutations qui n'est pas représentatif de ce qu'il se passe chez l'homme.

2.2. Les modèles combinés

D'autres modèles, en dehors de ceux basés sur l'unique modification de la génétique de la souris, permettent l'étude de la MA. Ils peuvent résulter de l'injection de substances chimiques, biologiques ou virales venant moduler la production d'A β ou le métabolisme de l'APP pour induire les caractéristiques de la MA.

Parmi ces modèles, les injections intra-crânielles de vecteurs viraux présentent un intérêt certain. L'approche des adénovirus (AAV) est relativement développée dans le cadre de l'étude de la MA. Ceci s'explique par leur nature non pathogène et leur facilité à transduire les cellules nerveuses conduisant à une expression du transgène plus rapide et plus durable (Ittner et al., 2019). Par exemple, l'injection d'un AAV codant pour le gène de l'APP portant les mutations Londonienne (V717I), Suédoise (KM670/671NL) et Autrichienne (T714I) permet d'observer une accumulation intracellulaire d'A β après 1 mois injection seulement et une hyperactivité des neurones 6 mois après injection. De plus, en utilisant cette approche dans un modèle de souris Tg (CX3CR1-GFP+/-) dont la microglie a été modifiée pour exprimer la protéine fluorescente GFP, il a été montré que celle-ci s'active 1 mois après injection (Koukoulis et al., 2016).

Une autre alternative est la méthode de xénotransplantation de cellules humaines dérivées d'iPSC ou d'ESC dans le cerveau de souris. Cette approche est largement utilisée dans le domaine de la biologie du neurodéveloppement et les maladies neurodéveloppementales. L'un des inconvénients de cette approche est qu'elle requiert généralement l'utilisation de souris immunodéficientes ou d'immunosuppresseurs pour éviter le rejet de greffe (Shultz et al., 2007).

Il n'existe à ce jour que très peu de modèles de la MA basés sur cette approche. L'un des plus cités est celui développé par Espuny-Camacho et ses collègues en 2017. Dans cette étude, les auteurs ont transplanté des NPC dérivés d'ESC dans le cortex frontal de souris Tg immunodéficientes WT et mutées pour les gènes APP/PS1 (double mutation APP K670N/M671L et PSEN1 L166P). Au bout de 4 mois, la greffe est capable de présenter les marqueurs de la MA à savoir la présence de PA associées à des neurites dystrophiques et une neuroinflammation similaire à celle de l'hôte. La neurodégénérescence a également été observée à 6 mois. A 8 mois, la présence de tau hyperphosphorylée ainsi qu'une conformation anormale, sont retrouvées dans la greffe humaine spécifiquement. Cet aspect est d'autant plus important qu'il n'a pu être reproduit dans les autres modèles non transgéniques jusqu'alors. Par ailleurs, les cellules humaines présentent un ratio tau 3R/4R similaire à celui observé chez l'homme permettant de se rapprocher un peu plus des conditions physiologiques humaines (Espuny-Camacho et al., 2017).

Cette méthode de transplantation peut également être utilisée pour l'étude d'autres types cellulaires comme la microglie, fortement perturbée lors de la MA. Ainsi en 2019, l'équipe de Bart de Strooper a développé un protocole de xénotransplantation de microglie dérivée d'ESC humain dans le cerveau de souris. Ils ont observé que la microglie différenciée présente un transcriptome similaire à celui observé chez l'homme, incluant également les gènes facteurs de risques pour la MA. Ils montrent également que la microglie greffée est capable de survivre et de s'intégrer dans les cerveaux de l'hôte 8 semaines après transplantation (Mancuso et al., 2019). Hu et ses collègues utilisent une approche différente en injectant le sécrétome issue de cellules iPSC de patient atteint de la MAf dans les ventricules de rat *in vivo*. Ceci leur a permis de mettre en évidence que les formes extracellulaires d'A β entraînent une altération de la plasticité synaptique *in vivo*.

Le développement des souris chimères par la transplantation d'organoïdes semblent également prometteur dans le cadre de la compréhension de l'étiologie de la MA. Une étude a révélé que ces derniers pouvaient s'intégrer physiquement et fonctionnellement dans le cortex somatosensoriel de rat. Les neurones issus de ces organoïdes présentent alors une morphologie et des propriétés synaptiques plus complexes que celles observées *in vitro*. Ils ont également pu comparer les transplants d'organoïdes

provenant de patient sains et malades et pousser ces analyses jusqu'à l'observation de l'intervention des organoïdes transplantés dans des comportements de recherche de récompense (Revah et al., 2022).

CHAPITRE 4 : LE MODELE BMI1

1. Régulation de l'expression génique et groupe polycombs (PcG)

1.1. Introduction à la régulation génique

L'organisation spatiale de l'ADN dans le noyau joue un rôle crucial dans la régulation et l'expression des gènes. La molécule d'ADN s'organise en double brin et s'enroule autour d'octamères d'histones (2H2A, 2H2B, 2H3 et 2H4) formant la particule de cœur des nucléosomes comme illustré dans la Figure 12. Ceux-ci se succèdent et forment une structure de 11nm appelé « collier de perle » qui se replie pour former une fibre de 30nm, la chromatine. Le niveau de compaction a son importance. En effet, lorsqu'il est enroulé au niveau des histones, l'ADN est moins accessible à la machinerie transcriptionnelle limitant ainsi l'activation des gènes.

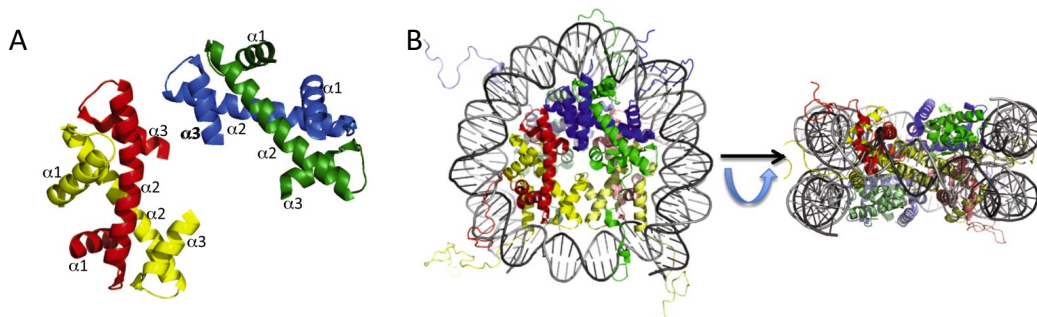


Figure 12 : Détail structural d'un nucléosome

A : Les histones H2A (vert), H2B (bleu) et les histones H3 (jaune) H4 (rouge) s'organise en dimères.
B. Association des dimères pour former l'octamère autour duquel s'enroule le double brin d'ADN pour former le nucléosome (Adaptée de Cutter and Hayes, 2015).

Il existe différentes manières de réguler l'expression génique incluant des éléments régulateurs de l'ADN (promoteur, enhancer, silencer et insulateur), des complexes de remodelage des histones, l'incorporation de variant des histones dans la particule de cœur ou encore par des MPT. Ce sont ces dernières qui seront détaillées ci-dessous. Les modifications des histones, principalement situées à leur extrémité N-terminale, sont responsables de la compaction et de la décompaction de la chromatine et à l'origine du dynamisme des nucléosomes. (Figure 13). Les modifications comprennent, entre autres, des acétylations et phosphorylations qui neutralisent la charge des histones et réduisent leur force d'interaction avec l'ADN et des ubiquitinations et méthylations qui, selon l'acide aminé ciblé, sa position et l'histone sur lequel il se trouve, signaleront l'activation ou la répression des gènes. Ainsi la méthylation sur l'histone H3 des lysines (K) en position 4, 36 et 79 est considérée comme une marque

de l'activation des gènes tandis que les méthylations sur l'histone H3 en K9/27 et sur l'histone 4 en K20 signaleront une répression (Zhang et al., 2015).

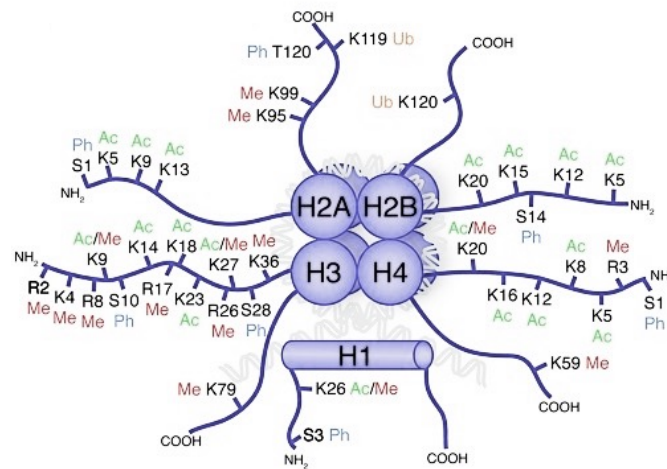


Figure 13 : Modification post-traductionnelle des histones.
(D'après Tollervey and Lunyak, 2012)

1.1. Les PcG

La méthylation et l'ubiquitination sont possibles grâce au recrutement de complexes protéiques appelés groupe polycombs (PcG). Leur découverte remonte en 1947 avec la publication des travaux de la biologiste américaine Pamela Lewis qui observe, par hasard, qu'une mutation dans le gène polycomb (Pc) entraîne une malformation phénotypique au niveau des pattes chez la Drosophile *Drosophila melanogaster*. Son mari le Dr. Ed Lewis, poursuit ses travaux et met en évidence, une trentaine d'années plus tard, le rôle des gènes homéotiques *Hox* et de leur activation différentielle selon l'axe antéro-postérieur, dans le développement de la drosophile soulignant l'implication des groupes polycomb dans le mécanisme de répression de ces gènes au cours du développement. Ces observations ont contribué à son obtention du prix Nobel en 1995 qu'il partage avec les Dr. Christiane Nüsslein-Volhard et Eric Wieschaus (Deutsch et al.; Kassis et al., 2017).

Les PcG ont rapidement par la suite été associés à de nombreux mécanismes cellulaires dont l'inactivation du chromosome X, le contrôle du cycle cellulaire ou encore la biologie des cellules souches. Leur diversité d'action s'explique par la variété de protéines qui les composent et qui s'associent selon le stade de développement et le type cellulaire de manière spécifique pour former différents sous-types de PcG. Les PcG complémentarisent l'activité des complexes TrxG, impliqués, eux, dans l'activation transcriptionnelle des gènes (Schuettengruber et al., 2017).

Les protéines qui composent les PcG s'organisent sous forme de complexe dit répressif (PRC). Les mieux caractérisés correspondent aux PRC1 qui entraînent une compaction de la chromatine par leur activité de E3-monoubiquitination au niveau de la lysine 119 de l'histone H2 (H2AK119Ub) et les PRC2 qui présentent une activité méthyltransférase et introduisent un ou plusieurs groupement méthyl au niveau de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me1-2-3) (Schuettengruber et al., 2017).

1.1.1. Les PRC1

Selon les protéines qui les composent, les PRC1 peuvent être divisés en 2 groupes à savoir les PRC1 canoniques (cPRC1) et les PRC1 variants ou non canoniques (ncPRC1). Chez les mammifères, ces deux sous-groupes partagent une base commune : la protéine RINGB ou son paralogue RINGA (RINGA/B) qui s'associe avec l'une des 6 protéines « Polycomb group RING finger » (PCGF1-6) au niveau de leur domaine RING. Le recrutement des protéines auxiliaires est conditionné par ces dernières. Ainsi, le cPRC1 peut être composé de la protéine PCGF2 ou de la protéine PCGF4 (« polycomb group RING finger protein 4 ») aussi connue sous le nom de BMI1 (pour « B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1 »), de l'une des 5 protéines chromobox CBX2, CBX4, CBX6-8 et de l'une des sous-unités polyhoméotique PHC1-3, tandis que le ncPRC1 qui peut se lier à l'ensemble des isoformes de la protéine PCGF comprendra une protéine de liaison RYBP ou YAF2 et de nombreuses autres sous-unités comme illustré dans la Figure 14. D'un point de vue fonctionnel, le dimère RINGA/B et PCGF1-6 forme le corps catalytique du complexe et facilite l'interaction avec la protéine Ubiquitine ligase E2 responsable de l'H2AK119Ub. Les sous unités auxiliaires, elles, régulent l'activité catalytique (Blackledge and Klose, 2021).

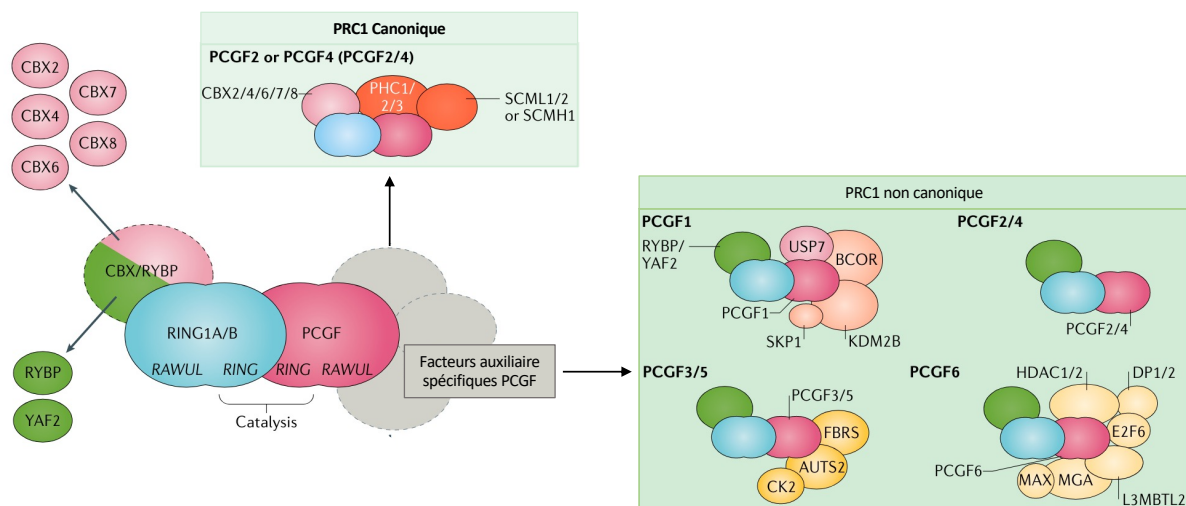


Figure 14 : Composition des PRC1 canoniques et non canoniques.
(Adaptée de Blackledge and Klose, 2021)

1.1.2. Les PRC2

Le corps des PRC2 s'organise sous la forme d'un tétramère comprenant les protéines de corps suivantes : La protéine RBBP4 ou 7 (en anglais, « *retinoblastoma-binding protein* »), SUZ12 (« *Suppressor of Zeste* »), une des protéines EZH1 ou 2 (« *Enhancer of Zeste* » 1 ou 2) et enfin la protéine EED (« *Embryonic Ectoderm Development* » en anglais). Ces deux dernières, lorsqu'elles sont associées au domaine VEFS de la protéine SUZ12, forment la partie responsable de l'activité catalytique du complexe. La protéine RBBP4/7 et la partie N terminale de SUZ12 jouent un rôle régulateur et interagissent avec des sous-unités spécifiques pour former 2 types de PRC2. Le premier (PRC2.1) comprend l'une des protéine PCL1, 2 ou 3 (« *Polycomb-like Protein* ») et soit l'une des protéines PALI1 ou 2 (« *PRC2-associated LCOR isoform* »), ou alors la protéine EPOP (« *elongin BC and PRC2-associated protein* »). Le deuxième, PRC2.2 comprend la protéine JARID2 (Jumonji and (A+T) -rich interaction domain-containing protein 2) et la protéine AEBP2 (adipocyte enhancer-binding protein 2). (Figure 15)

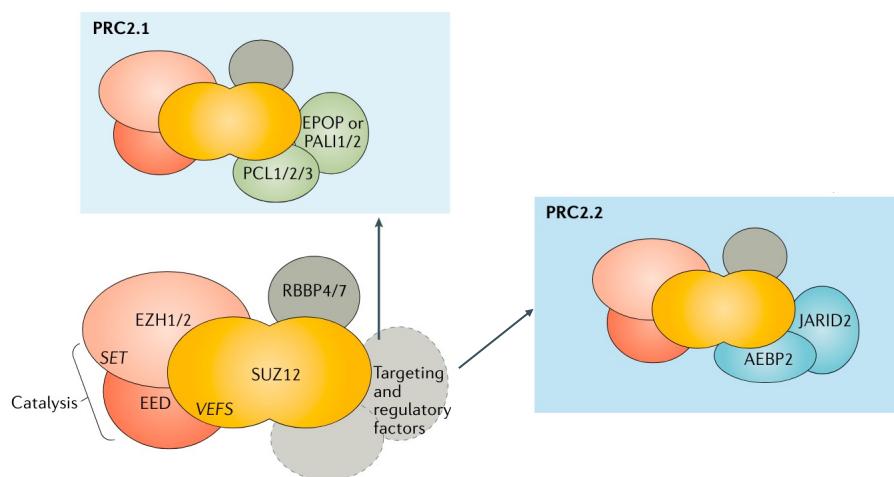


Figure 15 : Représentation du complexe PRC2 et ses sous types.
(Adaptée de Blackledge and Klose, 2021)

1.1.3. Recrutement des PcG et répression génique

Pour permettre l'ubiquitination ou la méthylation des histones ciblées, les PcG doivent se lier à l'ADN. Chez les mammifères, l'interaction de l'ADN et des PcG peut se réaliser directement au niveau de séquences spécifiques ou par le recrutement d'éléments intermédiaires.

Les PRC peuvent tout d'abord se lier à l'ADN grâce à certaines de leurs sous-unités capables de reconnaître des motifs spécifiques dans la séquence ADN. C'est le cas par exemple des sous-unités MAX ou MGA du ncPRC1 comprenant la protéine PCGF6 qui se dimérisent et reconnaissent les motifs E ou T box au niveau de la séquence ADN (Stielow et al., 2018). Dans le cas contraire, les PcG peuvent interagir avec des facteurs de transcription qui servent alors d'intermédiaire pour se lier aux séquences reconnues par ces derniers. Ils apportent alors une dimension contextuelle puisque leur expression dépend du type cellulaire et de l'état de développement (Blackledge and Klose, 2021).

Le recrutement des PcG peut également se produire au niveau des ilots de dinucléotides CG (CpG) ou CGI, régions de méthylation de l'ADN. Ces derniers se définissent par une région supérieure à 200 paires de bases et enrichie en CpG (Cain et al., 2022), et sont généralement associés au site d'initiation de transcription TSS. Les PcG peuvent alors interagir, de la même manière, directement par l'une de leur sous-unité comme c'est le cas du PRC2.1 qui se fixe au CGI par l'intermédiaire de la protéine PCL (Li et al., 2017).

La liaison des PcG à l'ADN peut également se faire par l'intermédiaire de long ARN non codant (lncARN) mais sont moins courants et contestés. Bien qu'ils soient impliqués dans l'inactivation du chromosome X par l'intermédiaire du lncARN XIST (Plath et al., 2003), la généralisation de ce phénomène n'est pas encore certaine. Certaines études renforcent cette hypothèse par la mise en évidence de l'interaction des PcG avec d'autres lncARN.

Une fois lié à l'ADN, les PcG s'organisent sous forme de domaines ou domaine PcG grâce aux recrutements d'autres PcG. Ce processus se produit en partie grâce à une communication étroite entre les PRC1 et les PRC2 qui peuvent reconnaître leur marque respective, permettant ainsi le recrutement des autres groupes polycombs. Leur action catalytique peut alors se propager et s'étendre sur de longs fragments pouvant atteindre plusieurs dizaines de kilobases. Ces domaines PcG s'organisent ensuite pour participer à la structure 3D de la chromatine dans le noyau (Blackledge and Klose, 2021).

La répression de la transcription des gènes peut alors avoir lieu à plusieurs échelles. Elle peut se traduire par le maintien de la structure 3D des domaines PcG, ou plus localement par l'intervention des différents PcG au niveau des régions cibles. La protéine BMI1 (PCG4), fait partie à la fois des cPRC1 et ncPRC1 et intervient donc dans la répression des gènes par son activité E3-ubiquitine ligase et la compaction de la chromatine (Abdouh et al., 2016).

2. La protéine BMI1 et son rôle physiologique

2.1. La protéine BMI1

La protéine BMI1 (PCGF4) est codée chez l'homme par le gène de même nom, localisé au niveau du chromosome 10p11.23. Elle se présente sous la forme d'une protéine nucléaire de 326AA de 37 kDa composée d'une partie N-terminale comprenant le domaine RING, suivi d'une partie centrale incluant le domaine RAWUL et se termine par une région C caractérisée par un domaine PEST riche en Proline (P), acide glutamique (E), en sérine (S) et en thréonine (T) (Bhattacharya et al., 2015; Chittock et al., 2017).

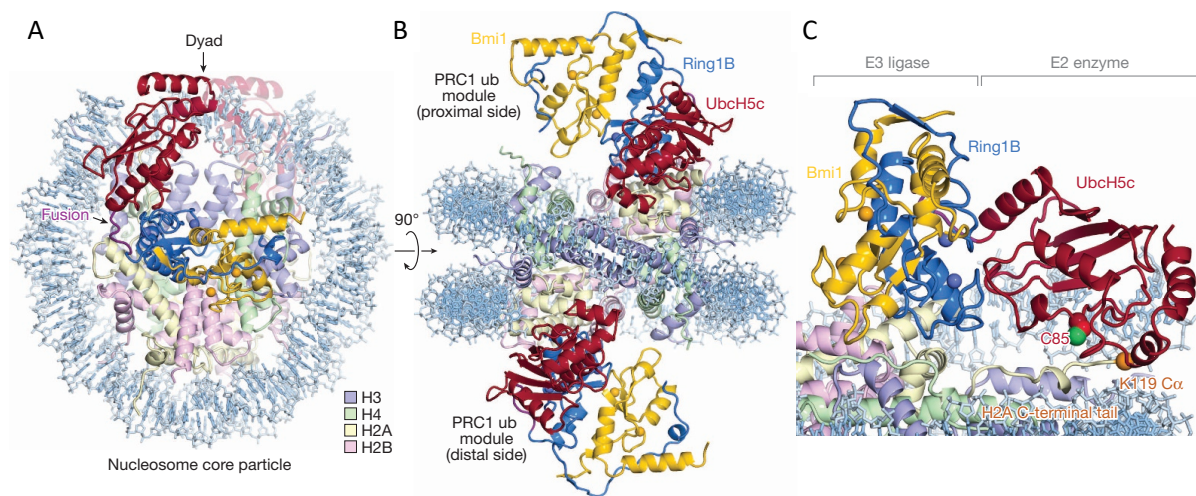


Figure 16 : Structure cristalline du domaine catalytique des cPRC1 et ncPRC1 incluant BMI1.

A. Vue contreplongée. B. Vue Orthogonale. C. Grossissement du domaine catalytique de l'interaction avec la protéine E2 ubiquitine ligase (UbcH5c). (D'après McGinty et al., 2014)

BMI1 intervient doublement dans les PRC1 dont elle fait partie intégrante. D'une part, elle s'associe à la protéine RINGA/B pour former le corps catalytique de l'ubiquitine ligase E3 permettant le transfert d'une ubiquitine par le recrutement de l'enzyme E2 (Figure 16). D'autre part, elle est responsable du recrutement d'une partie des autres protéines du complexe par son domaine RAWUL.

BMI1 est particulièrement importante puisqu'elle permet à la fois l'ubiquitination des histones mais est également essentielle dans le maintien de la structure spatiale de la chromatine. En particulier, il a été montré que BMI1 est essentielle au maintien de l'hétérochromatine péricecentromérique..

2.2. Rôle physiologique

Le rôle physiologique de BMI1 a pu être décrit *in vivo* dans des modèles murins. L'absence de BMI1 (BMI^{-/-}) *in vivo* a été associée à une diminution de la survie à la naissance et de la longévité, une sensibilité aux infections ainsi que des altérations hématopoïétiques et squelettiques (Van Der Lugt et al., 1994). Les souris homozygote BMI^{-/-} présentent également un phénotype progéroïde du cerveau et de la rétine associés à des altérations neurologiques dont une ataxie cérébelleuse, une perte des neurones corticaux et une augmentation du stress oxydatif dans ces derniers (Chattoo et al., 2009; Van Der Lugt et al., 1994). Ce terme progéroïde fait référence à celui observé dans le cas du syndrome de Hutchinson-Gilford, une laminopathie héréditaire qui, du fait d'altérations dans l'architecture nucléaire du noyau, se traduit par un vieillissement prématurée des personnes porteuses. (Navarro et al., 2008).

La protéine BMI1 intervient dans de nombreux processus biologiques et a été plus largement associée au développement par son rôle dans l'auto-renouvellement des CS notamment des SCN, dans la régulation du cycle cellulaire, dans la maintenance mitochondriale, dans la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) et dans l'homéostasie redox (Bhattacharya et al., 2015). L'expression de la protéine BMI1 varie selon le stade développemental et les tissus. Alors qu'elle est peu exprimée dans la majorité d'entre eux, elle présente une plus forte expression au niveau du thymus, du cœur, du cerveau et des testicules. L'action de BMI1 sur le maintien et le renouvellement des CS est possible par son interaction avec le locus INK4A/ARF qui code pour les protéines suppresseur de tumeurs p16^{INK4A} ou P14^{ARF} (P19^{ARF} chez la souris) impliqué dans la régulation du cycle et cellulaire et la senescence (Jacobs et al., 1999) illustré par la Figure 17. La répression du locus entraîne donc une diminution de l'expression respective de ces protéines entraînant une augmentation de la dégradation de la protéine p53 via l'interaction de la protéine P19^{ARF} avec la protéine MDM2 et une augmentation de l'activité des Cdk4 et Cdk6 par la diminution de leur interaction avec la protéine p16^{INK4A} (Bhattacharya et al., 2015).

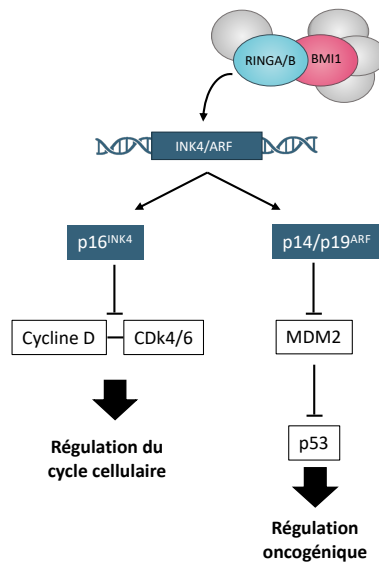


Figure 17 : Régulation oncogénique et du cycle cellulaire de BMI1 par la voie Ink4/Arf. (Adaptée de Bhattacharya et al., 2015). Produit à l'aide de biorender.

L'implication de BMI1 dans l'architecture nucléaire a également pu être montrée in vivo à l'aide de souris BMI1^{-/-} et de culture de neurones dérivés d'ESC de souris (El Hajjar et al., 2019). Les auteurs ont ainsi montré que BMI1 est nécessaire à la formation de l'hétérochromatine à travers la triméthylation H3K9 et qu'elle s'accumule au niveau des séquences répétées en réprimant leur expression. Ce processus est particulièrement important puisqu'il participe au maintien de la stabilité génétique. Ces études ont également montré une altération du noyau et de son enveloppe qui présente un phénotype irrégulier en cas d'inactivation de BMI1 (El Hajjar et al., 2019). Ces données viennent conforter le rôle, en particulier de BMI1, dans le maintien de l'intégrité génomique.

3. BMI1, vieillissement et Alzheimer.

Au regard des différentes fonctions cellulaires de BMI1, Abdouh et collègues se sont intéressés au rôle de celui-ci dans le vieillissement au niveau cérébral (Abdouh et al., 2012). Comme abordé dans la première partie de cette introduction, la senescence, la diminution du nombre de cellules souches, les dommages oxydatifs ou encore les altérations génétiques sont tous des marqueurs du vieillissement. Ces auteurs ont alors montré que l'expression de BMI1 diminue au cours du vieillissement, et qu'elle est corrélée à l'augmentation de la réponse inflammatoire, des marqueurs de sénescence et de dommage oxydatifs des neurones. En effet, la diminution de l'expression de BMI1 est associée à une diminution des capacités de défense cellulaire contre le stress oxydatif, mettant ainsi en avant le rôle protecteur de BMI1 (Abdouh et al., 2012).

Parmi les pathologies liées au vieillissement, la surexpression de BMI1 est particulièrement associée aux cancers pouvant notamment être causés par une augmentation de la répression du locus INK4A/ARF comme le cancer cervical (Zhao et al., 2023).

Plus récemment, BMI1 a également été associée *in vitro* et *in vivo* à la MA. Flamier et collègues ont constaté une diminution préférentielle de l'expression de BMI1 dans le cortex et l'hippocampe de patients atteints de la MAs, celle-ci n'étant en effet pas observée dans les échantillons provenant de patients MAF ou présentant d'autres types de démence comme la FTD. Cela a également été observée dans des cultures de neurones corticaux dérivés d'iPSC provenant de patient sAD. Ces derniers répliquent également *in vitro* les différents marqueurs de la pathologie tels que l'accumulation intracellulaire de p-tau et d'A β , l'accumulation extracellulaire d'A β ₁₋₄₂, une altération de l'arborisation dendritique ainsi qu'une augmentation de l'apoptose. La diminution induite de l'expression de BMI1 dans les neurones corticaux dérivés d'ESC provenant de patient sain a également permis de reproduire ces différents marqueurs, y compris l'altération morphologique et synaptiques. Flamier et collègues observent également que ces processus sont accélérés en l'absence de BMI1. Un approfondissement de recherches sur les mécanismes pouvant entraîner le phénotype induit par inactivation de BMI1 a par la suite permis de faire ressortir l'hypothèse selon laquelle cette dernière agirait sur une triade de protéines : MAPT, GSK3 β et la protéine p53 permettant *in fine* le développement de la MA. En effet, cette inactivation induite a été associée à une surproduction d'A β , de p-tau mais aussi de la protéine GSK3 β ainsi que de la protéine p53 phosphorylé (p-p53). Ainsi, BMI1 réprimerait directement le gène MAPT et serait impliqué de manière indirecte dans l'activité de GSK3 β et sur la stabilisation de P53. En cas d'une diminution de son expression, il y aurait donc une accumulation de p-tau accompagné d'une altération de la dégradation des protéasomes induite par l'activation ou la stabilisation de la protéine p53 comme l'illustre leur Figure ci-dessous. (Flamier et al., 2018)

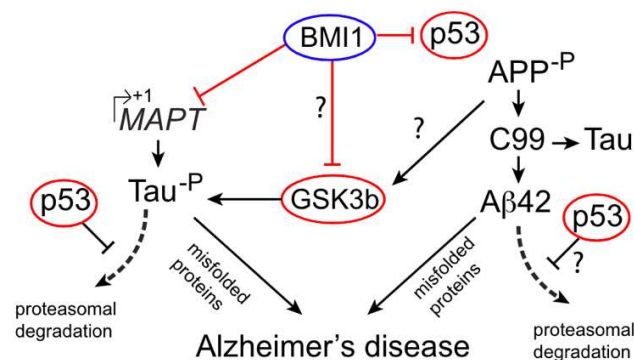


Figure 18 : Illustration du modèle proposé par Flamier et al. conduisant à la MA.
(Flamier et al., 2018)

Ces résultats obtenus *ex vivo* et *in vitro* à partir de neurones humains ont par la suite été observés dans un modèle murin hétérozygote pour la mutation BMI1 (BMI1^{+/-}) pouvant également porter une mutation dans l'APP (Tg-SwDI) (APP/BMI1^{+/-}). Les souris BMI1^{+/-} récapitulaient les marqueurs principaux de la MA à l'exception des PA et présentaient également des troubles cognitifs associés à une altération de la LTP ainsi qu'une perte synaptique et neuronale au niveau de l'hippocampe. Il a également été montré la combinaison des deux mutations APP/BMI1^{+/-} entraînent une apparition plus précoce des marqueurs et que ces derniers sont plus sévères. (El Hajjar et al., 2019)

L'ensemble de ces observations ont mené à l'hypothèse selon laquelle l'épigénétique et en particulier la modulation de l'expression de BMI1 pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans le cadre de la MA. La mise en évidence de variants du gène BMI1 et leur corrélation avec le niveau d'Aβ₁₋₄₂ dans le CSF (Kim et al., 2021), renforcent également l'hypothèse selon laquelle BMI1 serait significativement impliqué dans la MA. Ces recherches ouvrent de nouvelles pistes d'investigation pour l'étude de la MA.

Objectifs de la thèse

La MA est une maladie neurodégénérative affectant des millions de personnes dans le monde et dont il n'existe à ce jour aucun traitement curatif. Elle peut se présenter sous deux formes, héréditaire dite familiale (MAf) ou sporadique (MAS), qui, bien que similaires dans leurs phénotypes, se distinguent par l'âge d'apparition des symptômes. A l'inverse de la MAf précoce et dont l'origine est bien connue, celle de la MAS reste à élucider. La mise en place de modèles d'étude de cette pathologie repose donc essentiellement sur l'utilisation des mutations impliquées dans la MAf. Récemment, l'inactivation du gène *BMII*, impliqué dans le vieillissement, a été mis en évidence chez des patients atteints de la MAS spécifiquement ainsi que, in vitro, dans des neurones dérivés d'iPSC de patients également atteints de cette forme. La diminution induite de son expression dans des neurones dérivés d'ESC humaines a par la suite permis de reproduire les principaux marqueurs de la MA in vitro.

Mon projet de thèse a eu pour objectif d'étudier la MAS à l'aide d'un nouveau modèle basé sur la diminution partielle de *BMI1* dans des neurones corticaux dérivés de cellules iPSC humaines et transplantés chez la souris. Il s'est articulé autour de deux axes : Le premier a consisté à l'établissement de deux modèles de xénotransplantation, chez la souris adulte ou au stade embryonnaire (in utero) de manière à établir différentes approches d'étude des mécanismes et de la mise en place des mécanismes précoces de la MA. La xénotransplantation in utero permet le suivi du développement des cellules greffées dans deux régions du cerveau à savoir les LVs et le PFC, dans un contexte physiologique immunocompétent. Cette étape correspond à la première partie des résultats de mon manuscrit de thèse. Le deuxième axe a consisté à l'étude des conséquences d'une diminution partielle induite de *BMI1* dans les neurones corticaux dérivés d'iPSC d'un individu contrôle, dans un contexte in vivo chez la souris adulte. Il constituera la deuxième partie des résultats présentés dans ce manuscrit.

Résultats – Partie in utero

RESUME

Cette première partie de résultats démarre sur un premier chapitre de livre décrivant les différentes méthodes de xénotransplantation utilisées dans le cadre de l'étude du neurodéveloppement et des pathologies touchant le système nerveux central. Sont ainsi présentées la technique de transplantation de NPC aux stades embryonnaire (in utero), néonatal et chez l'adulte. Ce chapitre présente également les protocoles détaillés associés à ces méthodes.

L'article présente le suivi de NPC dérivées d'iPSC d'origine humaine marquées à la GFP (NPC-GFP), transplantées dans les LV ou PFC de souris immunocompétente au stade in utero. Cette étude a été entreprise à deux temps : 1 mois (1MPT) et 3 mois (3MPT) après transplantation.

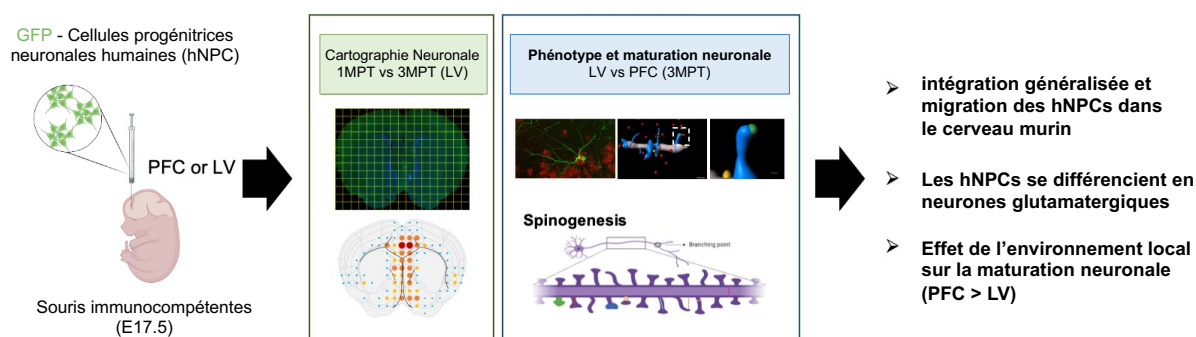


Figure 19 : Résumé graphique de l'article 1 de la partie in utero

Pour cette étude nous avons utilisé une lignée de NPC déjà présente au laboratoire et caractérisée. Ces cellules expriment la GFP et ont été préalablement triées selon leur intensité de fluorescence.

Dans un premier temps nous avons vérifié que les NPC-GFP se différencient en une population homogène de neurones corticaux immatures in vitro. Pour cela nous avons réalisé une analyse des transcrits par qPCR ciblant l'expression des gènes Oct4, Nestin, Pax6, Tuj1, VGlut1, VGAT, Cux1, CTIP2 et GFAP, combinée à des marquages immunohistochimiques dirigés contre Ki67, SOX2, Nestin, et GFAP.

La transplantation des NPC a été réalisée dans le système ventriculaire (ventriculaires latéraux, LV) et dans le PFC de souris immunocompétente au stade embryonnaire (E17.5). Cette étude s'appuie sur des analyses histologiques à 1 et 3 MPT. Pour cela, les souris ont été perfusées à la PFA 4% puis les cerveaux coupés au microtome pour obtenir des sections des 40µm.

Il a été montré que la survie des nouveau-nés est dépendante de la taille de la portée avec une survie plus importante lorsque celle-ci comprend moins de 14 petits.

Grâce au développement d'une méthode de quantification semi-automatisée, il a été possible d'analyser la distribution des neurones et de leurs projections lorsque transplantés dans les LV.

Ainsi, les résultats de cette étude montrent que les NPC s'intègrent dans le parenchyme murin et migrent dans différentes régions à la fois ipsi- et contra-latéralement dès 1MPT.

Les neurones transplantés dans les LV et PFC ont ensuite été caractérisés par marquages immunohistochimiques à 3MPT. Il a ainsi pu être montré que les neurones à 3MPT se différencient en neurones glutamatergiques. A l'inverse des neurones transplantés dans le LV, des neurones exprimant NeuN ont pu être retrouvés dans les greffes PFC et montrant une exposition plus forte à la β -III tubuline. Des marquages immunohistochimiques ont également pu mettre en évidence un recrutement de la microglie plus important dans la zone de greffe.

Enfin, une analyse morphologique des épines dendritiques s'appuyant sur leur reconstruction en 3D a permis de mettre en évidence que les NPC transplantées dans le PFC présentent un état de maturation plus avancé que celles transplantées dans les LV à 3MPT suggérant un effet de l'environnement cérébral de la souris hôte.

Cette étude a donc pu montrer que les NPC greffées au stade embryonnaire peuvent survivre, migrer et se différencier au sein du parenchyme murin mais aussi que le cerveau hôte influence le développement des neurones greffés. La technique *in utero* constitue une approche prometteuse dans l'étude du développement cérébral humain, d'autant plus qu'elle permet les analyses dans un environnement immunocompétent.

CONTRIBUTIONS

Concernant le chapitre de livre, j'ai co-écrit et réalisé les figures des parties concernant les techniques de transplantation in utero et adulte avec Maria Llach Pou. Le reste du manuscrit a été rédigé par le Dr. Isabelle Cloëz-Tayarani avec la participation de Aline Vitrac pour les approches de greffe néonatales et la mise en place finale des tableaux bibliographiques. J'ai ensuite participé avec les auteurs à la relecture du manuscrit dans son ensemble avant soumission.

Pour l'article 1 de ma thèse portant sur l'étude du devenir de neurones dérivés d'iPSC humaines dans deux régions du cerveau de souris in utero : Le projet a été initié dans sa conceptualisation par Uwe Maskos et le Dr. Isabelle Cloëz-Tayarani. J'ai ensuite participé à part égale avec Maria Llach Pou (MLP) aux mises au point et améliorations des conditions expérimentales initiales pour l'élaboration d'un protocole affiné et reproductible. J'ai réalisé la totalité des chirurgies et expérimentations, dans leur ensemble à part égale avec MLP. Nous avons été ponctuellement assistées pour la partie histologie par une étudiante en Master, Annousha Devi Govindan. La construction des outils lentiviraux a été réalisée exclusivement par Stéphanie Pons. La reconstruction par IMARIS et les quantifications ont été réalisées par Michiel Van Der Zwan (MVDZ), selon un protocole publié en collaboration avec Jean-Yves Tinevez (Hub d'analyse d'Image, Institut Pasteur). J'ai aussi réalisé à part égale avec MLP les différentes figures du manuscrit ainsi que l'élaboration des légendes. J'ai également participé à la rédaction des sections matériels et méthodes avec MLP, MVDZ et Isabelle Cloëz-Tayarani. La première version du manuscrit soumis a été rédigée par le Dr. Isabelle Cloëz-Tayarani. Tous les auteurs ont participé à la préparation de la version révisée après reviewing. J'ai participé avec MLP et MVDZ à la réalisation d'expériences supplémentaires nécessaires à cette révision avant acceptation par le Journal.

CHAPITRE DE LIVRE : Modèles de souris humanisées chimériques pour l'étude du développement neuronal humain et la pathogénèse des maladies cérébrales

Humanized Chimeric mouse models to study human neural development and pathogenesis of brain diseases.

Camille Thiberge^{1,2*}, Maria Llach Pou^{1,2*}, Aline Vitrac³, Uwe Maskos¹ and Isabelle Cloëz-Tayarani^{1§}.

¹ Integrative Neurobiology of Cholinergic Systems, CNRS UMR 3571 “Genes, Synapses and Cognition”, Institut Pasteur, Paris, France.

² Sorbonne Université, Collège doctoral, Paris, France.

³ Human Genetics and Cognitive Functions, CNRS UMR 3571 “Genes, Synapses and Cognition”, Université de Paris, Institut Pasteur, Paris, France.

* These authors contributed equally.

§ Corresponding author: isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France



Humanized Chimeric Mouse Models to Study Human Neural Development and Pathogenesis of Brain Diseases

Camille Thiberge, Maria Llach Pou, Aline Vitrac, Uwe Maskos, and Isabelle Cloëz-Tayarani

Abstract

The development of humanized neural chimeric mouse models consists in grafting human neuronal progenitor cells (NPC) or differentiated neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) into the mouse brain at different time points. As the main features of cortical networks and their alterations during brain development cannot be reproduced *in vitro*, these *in vivo* models have been used to investigate the mechanisms by which reprogrammed human neurons and non-neuronal cells integrate and migrate into the mouse brain at early stages of brain development and display functional activities several months after their grafting. Here, we describe the neonatal grafting technique of human NPC which we use in our laboratory. We also present a new method based on the grafting of human NPC into the brain of mouse embryos, *in utero*. A third method consists in the stereotaxic grafting of human NPC into selected brain regions of adult mice. The iPSC technology combined with the use of chimeric mouse models offers numerous possibilities to study human neural development within well-controlled and defined temporal windows and to model neuropathological disorders.

Key words Xenografting, *In utero* transplant, Human stem cells, Induced pluripotent stem cells, Chimeric mouse models, Neurodevelopment, Neurodevelopmental Disorders

1 Introduction

The reprogramming of human embryonic stem cells (ESC) or induced pluripotent stem cells (iPSC) into neuronal progenitor cells (NPC) and mature neurons is of major interest to study brain development during the critical periods of establishing diversity, connectivity, and functional maturation of neurons within the central nervous system (CNS). These properties are particularly important within the cortical regions and the targeted areas of their innervation. A specificity of the cerebral cortex resides in the

Authors Camille Thiberge and Maria Llach Pou have equally contributed to this chapter.

existence of multiple cortical sections that are structurally and functionally organized into connected units to exert different functions through a large variety of neuronal subtypes [1]. At later stages of development, postmitotic neocortical neurons conserve a high degree of plasticity which allows the postnatal reorganization of specific neural microcircuits in vivo [2].

To date, different ESC and iPSC reprogramming protocols have been developed which can be used to produce various neuronal subtypes [3]. In particular, the reprogramming of stem cells into human cortical neurons has made it possible to study various developmental features after their grafting within the prefrontal cortex [4]. Interestingly enough, it has been shown that grafted ESC-derived human cortical neurons can integrate functionally into the lesioned mouse brain, when their cellular identity corresponds to that of the brain area under grafting [5]. In humans, the cortex is organized into six layers [6] which contain neurons with selective spatial organization and distinct biochemical, morphological, and electrophysiological characteristics [7–10]. The axonal projections of these cells are also specific not only to their cortical location but also to the neuronal phenotype. Thus, the excitatory pyramidal cortical neurons project into various but specific regions of the brain, while the interneurons' projections remain local within the cortical layers.

Xenografting of human neuronal progenitor cells into a rodent host allows their study in vivo on an extended time scale (up to 10–12 months) [11, 12] as compared to in vitro studies (70–80 days in culture) [13]. In addition to such an important temporal aspect, the growth of human xenografted neurons takes place in a vascularized environment, which is essential for the survival of the transplanted cells. It has also been shown that the oligodendrocytes of host mice have the ability to myelinate the axons of grafted human neurons [4], which is an essential process to their long-term functional activity. The cortical identity of the grafted neurons, which depends on the layer in which they are positioned, as well as the temporal characteristics of their development is also maintained after transplantation [4, 11, 14]. Thus, the maturation of human neurons can take place over several months despite their development in a more mature murine environment [11]. A recent study has shown that when NPC are transplanted together with deep-layer cortical neurons into the brain of adult mice, the first synapses are visible after only 20 days of development and their number increases gradually overtime [14].

A summary of the xenografting studies carried out to date with human cells is presented in Table 1. It should be noted that most of these studies have been performed in newborn or adult rodents with ES- or iPS-derived human neurons. The main phenotypes studied are also indicated, whether they are morphological and/or functional.

Table 1
Reported studies using xenotransplantation of human stem cell-derived neurons

Human cell origin	Host	Brain region	Graft integration	Functionality	References
Fetal brain cells	Rat embryo	Brain ventricles	Widespread incorporation of neurons	n.d.	[22]
Embryonic NSC	Adult rat	SVZ and Hp	Migration along the routes taken by endogenous precursors. Substantial migration within the striatum	n.d.	[23]
Fetal brain cells	Mouse neonate	Brain ventricles	Proliferation, migration, and neural differentiation (7 MPT)	n.d.	[24]
NSC	Monkey fetus at 12–13-week gestation	Brain ventricles	At 16–17 weeks of gestation: Two subpopulations: Differentiated neurons and glia Undifferentiated cells (SVZ)	n.d.	[25]
ESC-derived NPC	Mouse neonate	Brain ventricles	At 1–4 WPT: Incorporation of cells in cortex, Hp, OB, septum, thalamus, hypothalamus, striatum midbrain, and some white matter regions Differentiation into neurons and astrocytes	n.d.	[26]
ESC	Chick embryo	In ovo grafting into somites; 1.5–2 days of development	6–7 days post-surgery Differentiation and migration into DRG, neural tube	n.d.	[27]
Immortalized NS-like cells	Rat with focal cerebral ischemia	i.v. injection	Differentiation into neurons and astrocytes in lesioned areas; survival up to 56 days after grafting (cortex and striatum)	Generation of AP and synaptic integration- Miniature EPSC	[28]
Differentiated ESC	Mouse embryo (E14)	Brain ventricles	2 MPT: Widespread incorporation including within cortex and hippocampus	8 MPT: Action potentials	[29]

(continued)

Table 1
(continued)

Human cell origin	Host	Brain region	Graft integration	Functionality	References
ESC-derived NPC	Young/adult rat brain	Brain ventricles	Integration into SVZ; migration along the rostral migratory stream to olfactory bulb; contribution to neurogenesis	n.d.	[30]
ESC-derived DA neurons (+ astrocytes)	6-OHDA-lesioned adult rat	Striatum	Substantial neuronal recovery	Behavioral testing	[31]
ESC-derived striatal progenitors	Adult rat	Striatum	Xenograft overgrowth and persistent proliferation of NPC	n.d.	[32]
ESC-derived DA neurons	Parkinsonian models in mouse, rat, and monkey	Striatum	4–5 MPT. No neural overgrowth. In vivo survival. Restoration of behavioral symptoms	Membrane potential oscillations	[33]
ESC-derived retinal progenitors	Mouse neonate	Subretinal space and intravitreal space	Migration in mouse retina. Differentiation into functional photoreceptors	Restoration of visual functions in <i>Crx</i> -deficient mice	[34]
ESC-derived neural rosettes	Adult rat	Striatum	Survival and integration 4 weeks after transplantation	n.d.	[35]
iPSC-derived DA neurons from patients with Parkinson	Adult rat	Striatum	4–16 WPT: High level of cell survival, arborization with few projections into host striatum	Reduced motor asymmetry of 6-OHDA-lesioned rats	[36]
ESC-derived cortical neurons	Mouse neonate	Cortex	Integration, establishment of specific axonal projections and dendritic patterns of cortical neurons	9 MPT: Firing patterns, synaptic potentials	[4]

ESC-derived MGE-like cells	Mouse	Hippocampus	Synaptic connections with endogenous neurons	Improvements in learning and memory deficits	[37]
PSC-derived MGE progenitors	Mouse neonate (P2)	Cortex	3–7 MPT: Cell migration in the cortex; maturation into GABAergic interneuron subtypes	7 MPT: Firing patterns, synaptic potentials	[38]
Fetal NSC	Monkey	Midbrain	Generation of neurons that project long fibers in adult brain (+GDNF)	n.d.	[39]
ESC- and iPSC-derived interneurons	Mice	Hippocampus	Differentiation method to MGE or CGE cells and subclasses of GABAergic interneurons	n.d.	[40]
ESC-derived cortical neurons	Adult mouse	Lesioned visual cortex	Restoration of damaged cortical pathways	Mature electrical neuronal profile	[5]
iPSC-derived NPC	Mouse neonate (P0)	Brain ventricles	Migration and wide dispersion of transplanted cells into the mouse brain (detection in the cerebellum at 6 MPT) Differentiation into excitatory neurons, astrocytes, and oligodendrocytes	Functional mature neurons at 13 MPT	[41]
MGE-derived progenitors	Mouse neonate (P1-4)	Dorsal hippocampus	Differentiation of transplanted cells in PV and SOM interneurons	Functional inhibitory synapses with the host	[42]
ESC-derived interneurons	Adult rat	Prefrontal cortex	In situ differentiation of PV interneurons after grafting	Firing analysis of the host pyramidal cells	[43]
iPSC-derived progenitors and cortical excitatory neurons	Adult mouse	Somatosensory cortex	Graft vascularization 5 MPT: long-range selective projections	Inhibitory and excitatory inputs, firing patterns	[14]
PSC-derived cortical interneurons	Mouse	Cortex	Protocol optimization for cell banking before grafting. Graft integration and cell migration	n.d.	[44]

(continued)

for

Table 1
(continued)

Human cell origin	Host	Brain region	Graft integration	Functionality	References
iPSC-derived interneuron precursors	Rat model of epilepsy	Hippocampus	Synapse formation between graft-derived axons and host hippocampal excitatory neurons in DG and CA1 field	Involvement of graft-derived interneurons in seizure control	[45]
Embryonic PSC-derived cortical neurons	Mouse neonate (P0-1)	Brain ventricles	Integration in the mouse cortex as single cells	10 MPT: mature firing patterns	[11]
H9 stem cell-derived NPC	Adult mouse and rat	Frontal cortex	Transduction with human channel rhodopsin. At 3MPT: differentiation into GABAergic neurons. Dense terminal fields and innervation of dendrites in host cortical neurons	Light stimulation of hChR2-hNP transplants: variability in grafted neuron response	[46]
MGE-derived interneurons	ASD model and WT mouse neonate (P1-3)	Prefrontal cortex	At 8 WPT: Integration into PFC, anterior cingulate, dorsal insular, primary motor, and somatosensory areas In WT mouse: higher differentiation into SOM interneurons In ASD mouse model: higher differentiation into PV interneurons	Rescue of social interaction of ASD model mouse	[47]
iPSC-derived NPC	Mouse neonate	Frontal cortex/brain ventricles	At 2 MPT: Axonal projections in the mouse cortex Differentiation into pyramidal neurons, SOM neurons, astrocytes, and oligodendrocytes 4 MPT: Graft vascularization	n.d.	[12]

iPSC-derived NPC	Mouse neonate	Frontal cortex or brain ventricles	At 50 DPT into: Brain ventricles: migration to olfactory bulbs following the rostral migratory stream Cortex: axonal projections into different brain areas following white matter fibers (fimbria and stria terminalis)	n.d.	[15]
ESC-derived midbrain DA or cortical glutamate neurons	Adult Parkinson mouse model	Substantia nigra or striatum	Projection of axons in different brain areas depending on neuron subtypes	Functional (/anatomical) synaptic inputs dependent of neuronal subtypes (/graft site) Rescue of motor deficits by dopaminergic grafted neurons	[48]

Abbreviations: AP action potentials, ASD autism spectrum disorders, CGE caudal ganglionic eminence, DA Dopaminergic, DPT days post-transplantation, DRG dorsal root ganglion, EPSC excitatory postsynaptic current, Hp hippocampus, MGE medial ganglionic eminence, MPT month post-transplantation, OB olfactory bulb, PSC pluripotent stem cells, PFC prefrontal cortex, PSC pluripotent stem cells, PV parvalbumin, SOM somatostatin, SVZ subventricular zone

neonatal transplants. This protocol has provided the means to analyze some of the processes which take place during the early stages of neuronal maturation, and on the role of SHANK3, a postsynaptic protein which is altered in autism spectrum disorders (ASD) as we reported previously [15]. In the course of this study, we also found that the maturation of the same reprogrammed neurons was slower in vivo as compared to in vitro conditions, using the same cells in both studies [15, 16].

We will then describe a step-by-step protocol which consists in grafting human-derived NPC in mice in utero. This new method, which has not been used in mice to date, provides the means to study the early stages of human development and neural precursor events before they start differentiating. Another important aspect resides in the fact that in utero grafting allows the use of immunocompetent mice. Finally, we describe a transplantation method in adult mice which can be particularly adapted to the grafting of inhibitory neurons which have limited projections to cortical areas. We will highlight the diverse applications of each of these methods for studying different pathologies at their earliest stages during brain development.

2 Materials

2.1 Media

NPC Culture Medium The culture medium consisted of 500 mL of DMEM/F-12 mixed with 500 mL of Neurobasal medium and supplemented with two vials (5 mL each) of N2 supplement (GibcoTM, ref. 17502048), two vials (10 mL each) of B27 supplement (GibcoTM, ref. 17504044), 10 mL of penicillin-streptomycin (penicillin = 10,000 units/ml and streptomycin = 10,000 units/mL), and 0.1 mM of 2-βmercaptoethanol. Growth factors were selectively added as described in Fig. 1.

Flask Coating Culture flasks were initially coated with Geltrex (GibcoTM ref. A1413302) diluted to 1/100 in DMEM/F-12 and incubated for at least one hour at 37 °C.

The following is the list of primary antibodies and their corresponding secondary antibodies as well as DAPI reference

Primary antibody			Secondary antibody		
Name	Ref	Dilution	Name	Ref	Dilution
Anti-GFP rabbit serum	A6455, Invitrogen	1/750	Donkey anti-rabbit Alexa 488	DZP030, Jackson Interchim	1/200

(continued)

Primary antibody			Secondary antibody		
Name	Ref	Dilution	Name	Ref	Dilution
Anti-GFP rabbit serum	A6455, Invitrogen	1/750	Donkey anti-rabbit Alexa 594	Jackson Interchim	1/200
Rabbit anti-VGluT1	135303, Synaptic Systems	1/1000	Donkey anti-Rabbit Alexa 488	DZP030, Jackson Interchim	1/200
DAPI	D9542, Merck	1/200			

Equipment Stretcher apparatus (Narishige PB-7 needle puller), glass pipettes: dimensions: 1.0 OD $\times$ 0.78 ID $\times$ 100 L mm, Sterile Towel Drape 18" $\times$ 26" – 46 $\times$ 66 cm (4410-IMC) Imcoinc; Harvard Syringe Pump (Harvard apparatus PHD 2000); vibratome (Leica Biosystems, V1000S); microtome (Leica SM 2010R); confocal laser scanning microscope with a 488 nm laser for GFP excitation, and a 555 nm laser for mCherry excitation.

3 Methods

3.1 Neuronal Progenitor Cells (NPC) from Human iPSC Lines

The purpose of this section is to specifically describe the protocols which allow amplification and labeling of neuronal progenitor cells (NPC) before their grafting into the mouse brain.

For this study, we used two control cell lines from Coriell Biorepository (Coriell Institute for Medical Research), the GM04603 (<https://www.coriell.org/Search?q=GM04603>) and GM01869 (<https://www.coriell.org/Search?q=GM01869>). Their derivation into NPC and their characterization have been described elsewhere [17]. For protocol optimization, we used the WTSli002-A line (<https://cells.ebisc.org/WTSli002-A/> Wellcome Trust, UK) as in a previous study [18]. Protocol modifications result from the constant development of new commercial products to simplify and optimize iPSC-derivation protocols, without altering the cell differentiation. For the illustrations presented here, we only selected the original data obtained with the GM04603 iPSC line. Figure 1a shows the experimental conditions used, according to Boissart et al. (2013) [17], to derive human iPSC with slight modifications. Figure 1b shows NPC amplification and labeling, with the selected growth and transcription factors used in this study. Figure 1c describes the map of a lentiviral vector for GFP labeling [15].

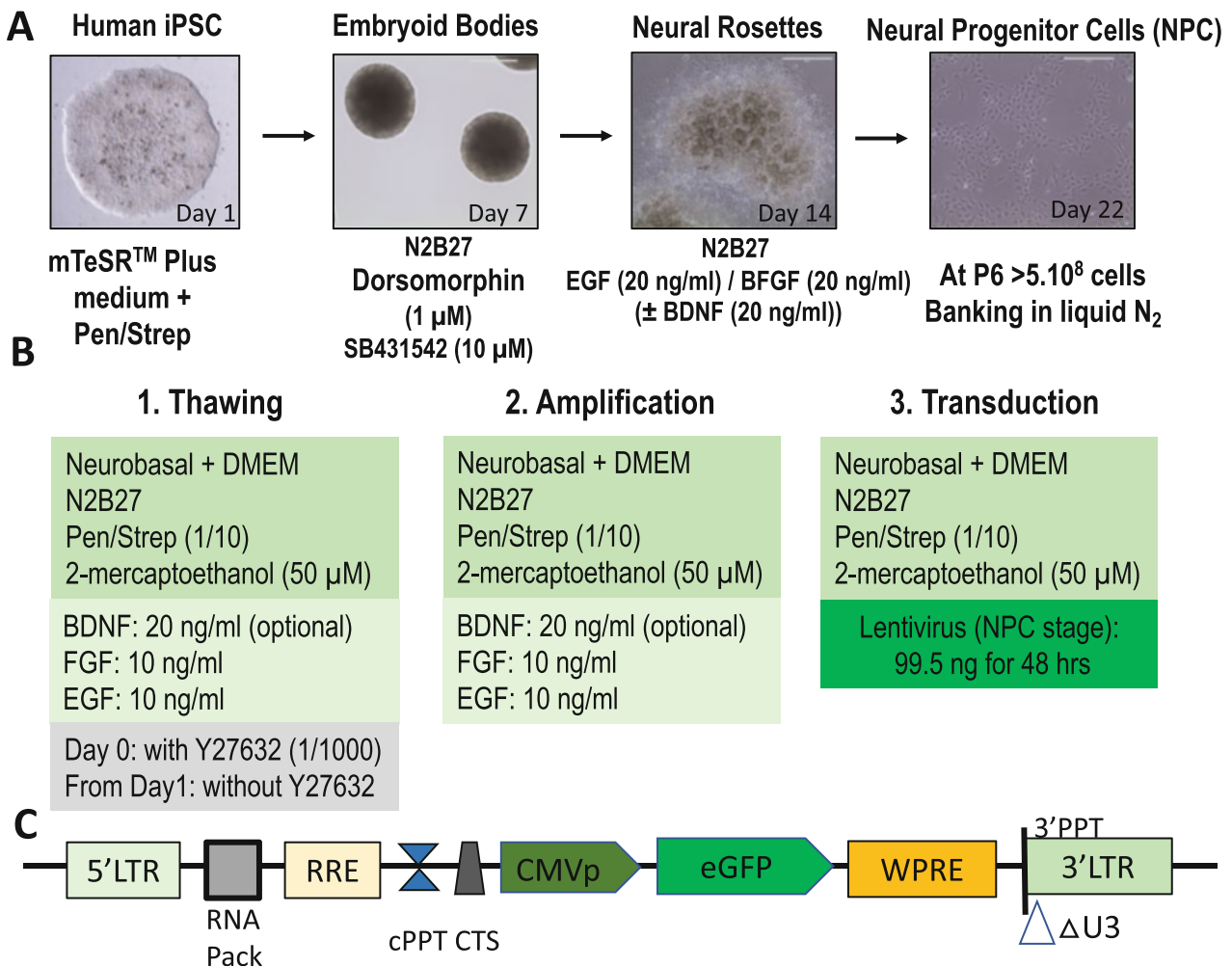


Fig. 1 In vitro cell differentiation, amplification, and labeling before engraftment. **(a)** Human iPSC are first amplified and then differentiated in early cortical progenitors, and then to NPC with further amplification before banking. **(b)** Description of NPC amplification and labeling before grafting into mouse brain. GFP labeling (green fluorescence) can be started directly from the stock of frozen NPC. **(c)** Schematic representation of the lentiviral construct for transduction of NPC with GFP using a human cytomegalovirus promoter (CMVp)

3.2 NPC Labeling and Amplification

All the following steps were performed in sterile conditions under the flow hood. For their labeling, NPC were transduced with a CMV-GFP-lentivirus (green fluorescence) or with a CMV-mCherry-lentivirus (red fluorescence) as described previously [13]. Lentiviral vectors were prepared according to a published protocol [19]. The map of the CMV vector is detailed in Figure 1c. NPC were transduced with 99.5 ng of lentivirus in a 6-well culture plate filled with 500 μL of fresh culture medium for 3 h. The volume was completed to 2 mL and incubated for the next 48 hours, and then rinsed with culture medium. For co-transplantation with two distinct populations [15], transduced NPC should be initially purified by FACS to inject equivalent levels of green or red fluorescence intensities within cells. In the case of co-transplantation, the two populations of labeled NPC should be amplified using the same culture medium.

For amplification, NPC were thawed in T75 flasks at a density of 50,000 cells/cm² in 25 mL of NPC medium supplemented with Rock inhibitor Y27632 (10 μ M). The next day, medium was changed in order to remove the Rock inhibitor. Once confluency was reached, cells were passaged into a T175 flask. Medium was changed every 2–4 days during NPC amplification.

3.3 Grafting into Mouse Neonates

Cultured NPC were dissociated and resuspended in DPBS (10⁵ cells/ μ L) before their transplantation into the neonatal brain. GFP-labeled cells were transplanted into the motor cortex of immunodeficient NOD/SCID mice (Charles River Laboratories), at postnatal days 1–2. Pups were first locally anesthetized using a lidocaine gel. The head of newborn pups was gently held horizontally between the operator's fingers. Bregma was used as a visible landmark to localize the injection site. We used the published coordinates dorsolateral = +1 mm, anteroposterior = –1 mm, depth = –1 mm to target the cortex, or depth = –2 mm to target the ventricles. Two μ L of resuspended cells were slowly injected unilaterally using a Hamilton syringe (Hamilton, ref. 65460). The syringe needle was set for injecting at 1- or 2-mm depth and kept in the pups' brain for 30 s following the injection before its removal. The injection lasted over 1 min. This protocol was approved by the Institut Pasteur Ethics Committee and the French *Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de l'Innovation* under reference APAFiS #20686. The accuracy of injection was monitored by immunofluorescence labeling of GFP-labeled transplants, after brain slicing at different periods post-injection. All pups per litter were injected and their survival was evaluated at ~60%. For analysis, we recommend keeping only the mice that present well-defined GFP-labeled transplants within the same cortical areas. We excluded the brains with small number of labeled transplanted cells from analysis even though they presented similar phenotypes.

3.4 In Utero Grafting of Mouse Embryos

This protocol was approved by the Institut Pasteur Ethics Committee and the French “Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de l'Innovation” under reference APAFiS #25221. Swiss OF1 mice (Charles River Laboratories) were habituated to the animal facility at least 3 days, and surgeries were performed at the embryonic stage of E17.5. We observed that this developmental stage allows high rate of pup's survival (~65%).

3.4.1 Material and Equipment Settings

A Hamilton syringe was connected to the pump by a plastic capillary, at the end of which a sterile glass micropipette was fixed (~50 μ m diameter). Parafilm can be used to tightly connect plastic and glass micropipette. Before each surgery, the Hamilton syringe was filled with sterile distilled water and placed in a Harvard pump. A set of glass injection micropipettes were prepared by hand, using

the needle puller, without any further autoclaving. These are the only type of needles that can be used for in utero injection. Once embryos were ready to be injected, the glass micropipette was carefully filled with cell suspension ($\sim 10^5$ cells/ μL), to avoid the formation of air bubbles. Injection settings were as follows: infusion rate, 30,000 $\mu\text{L}/\text{min}$; target volume, 2 μL ; and diameter, 0.4600 mm. Depending on experimenter, the injection can be performed using a magnification loupe or under a dissection microscope, or directly without any magnification device. At the stage E17.5, the ventricles can be easily distinguished in the Swiss OF1 mouse strain. Cold light and sterile surgical instruments are necessary and should be ready to use.

3.4.2 *In Utero Surgery Procedures*

Before their grafting, cell suspensions were prepared according to the protocol described in Subheading 3.2 and kept in a water bath at 37 °C. For the in utero approach, the injection solution also contains 20 mM EGTA [11, 20] in sterile DPBS to dissociate apical junctions in the neuroepithelium and avoid cell aggregation upon transplantation. For transplantation, we injected 2 μL containing $2 \cdot 10^5$ cells within one lateral ventricle of E17.5 embryos. Thirty minutes before surgery, buprenorphine (0.05–0.1 mg/kg) was injected subcutaneously at the back of the neck of pregnant mouse, for initial analgesia. The pregnant mouse was then anesthetized in a box with isoflurane and oxygen delivered via a continuous flow anesthesia unit and then placed on a heating pad which was also connected to the anesthesia unit. A drop of Ocryl gel was applied on each eye to avoid eye dryness. The abdomen was shaved locally for ventral laparotomy at the white midline level. A betadine solution was applied on the skin, and then rinsed with 70% ethanol using cotton swabs. A lidocaine gel was applied locally, before and after the laparotomy. Before starting the surgery, the sterile towel drape was positioned on the mouse abdomen. An incision of 1–1.5 cm was made in the lower abdomen in a manner to cut both the skin and the thin fascia layer. Abdominal organs should not be injured during this critical step. The whole uterus was carefully extracted from the abdomen, right and left ovaries were identified, and the total number of fetuses was counted. During surgery, drops of sterile PBS kept at 37 °C were consistently applied on the exposed fetuses. Then, each fetus was held to clearly identify the lateral ventricle. The fetus was stabilized between the thumb and forefinger within or close to the amniotic cavity. Any fetus rotation or damage should be avoided as it can affect embryo survival. The sharp glass pipette was carefully inserted through the fetal skull, and cells were injected into each fetus, except the first one to be delivered, on each uterine horn. After the injection, the pipette was carefully withdrawn with well-controlled movements. Note that leakage of amniotic fluid should not be observed.

Injections should not take more than 15–20 min per mouse. If the duration of injection is longer, some of the injected fetuses can be put back into the abdomen to keep them at the body temperature. Then, the uterus was carefully reentered into the abdominal cavity in a way to avoid any twist between the embryos and with a controlled holding pressure. The peritoneal cavity was rehydrated with 0.5–1 mL of sterile PBS to replace any fluid loss during the surgery. Then, the incision was closed with two types of sutures: for fascia and skin, we used sterile resorbable suture (ProleneTM, EH7471, Ethicon, LLC) and non-resorbable suture (Coated Vicryl, V302, Ethicon, LLC), respectively. After the surgery, the pregnant mouse was replaced in its own cage and positioned on a warming pad until the mouse was fully awake. Analgesia treatment (acetaminophen 4 mg/20 mL) was administered in drinking water for 3–5 days after the surgery, and stress (noise, excessive manipulation of cages, etc.) was minimized to avoid preterm delivery. Hydrogel was also given to mice for 1 day after surgery. We observed that grafted cells' distributions and density may slightly vary between each embryo, due to a possible aggregation of cells in the pipette and during injection. We could observe that the presence of EGTA significantly reduces cell aggregation, and increases the possibility of identifying single cells within the mouse brain, as described previously [11].

For a first in utero test or training, it is recommended to inject 1–2 μ L of fast green or bromophenol blue solutions, without cells. If correctly injected into lateral ventricle, the solution will immediately fill the whole embryonic ventricular systems. In that case, the pregnant mouse and embryos should be sacrificed immediately by profound anesthesia followed by cervical dislocation.

3.5 Grafting into the Dentate Gyrus of Adult Mouse Brain

The protocol for cell preparation is identical to that for in utero grafting. Experiments were performed with adult NOD-SCID mice (Charles River Laboratories).

As for in utero grafting, the mice received an injection of buprenorphine (0.1 mg/kg) for initial analgesia 30 min before anesthesia by isoflurane. The mouse was placed on a stereotaxic frame connected to an isoflurane unit and to a heating pad. A drop of Ocryl gel was applied on each eye to avoid dryness. The skin was shaved and cleaned with betadine followed by 70% ethanol. For a local anesthesia, 150 μ L of lidocaine (7 mg/kg) were injected subcutaneously at the skull level at least 10 min before the skin incision. Using a driller, two holes were done at the following coordinates A/P: -1.8 ; M/L: ± 1.25 for targeting the DG according to the Paxinos and Franklin Atlas [21]. Twenty nanoliters of cell suspensions were injected bilaterally at a rate of 3 nL/s in three steps along the D/V axis: 15 injections at -1.82 depth, 20 at -1.76 , and 15 at -1.72 to achieve a final volume of

1 μL /hemisphere. To ensure reproducible injection volumes, we recommend to wait 10 s between each injection and 5 min before removing the glass capillary from the brain tissue.

For mouse recovery, Metacam (0.05 mg/kg) and 200 μL of sterile saline were injected separately subcutaneously before the end of anesthesia (~ 50 μL /mouse). As post-operative care, Metacam (1 mg/kg/day) diluted in diet gel was given for at least 3 days. Mice were monitored for 5 days.

3.6 Immuno-fluorescence Labeling

For immunofluorescence labeling, mice received a lethal dose of a mixture of ketamine (Imalgene, 100 mg/kg, Merial) and Xylazine (Rompun, 10 mg/kg, Bayer), and were transcardially perfused with 15 mL of DPBS, followed by 50 mL of ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were removed and post-fixed overnight. Forty μm -coronal sections were obtained using a vibratome or a microtome, collected in 12-well or 24-well culture plates containing DPBS supplemented with 0.02% azide, and stored at 4 °C until use. Free-floating sections were rinsed twice in DPBS (pH 7.4) and then incubated in DPBS solution containing 0.5% Triton X-100 and 10% serum at room temperature for 30 min to block nonspecific binding. Primary antibodies were diluted in blocking solution and incubated overnight at 4 °C. In order to improve the labeling of neuron morphology, immunofluorescence was performed using an anti-GFP antibody in permeabilized conditions. An additional DAPI staining diluted in DPBS was performed for 10 min at room temperature.

3.7 Representative Data

In this chapter, we describe three different approaches for grafting the human NPC which result in the integration of human cells into the brain of adult mouse. Figure 1 illustrates the different steps of the protocol which we used for amplification, banking, and labeling of NPC before their grafting. We have previously shown that the neonatal engraftment of human NPC can lead to neurons that are able to differentiate into glutamatergic neurons [12, 15]. Figure 2 illustrates the precise site of injection and the cortical graft containing a large density of neuronal cell bodies together with numerous axonal projections within distinct brain regions. The full cartography of axonal projections in the brain has been published elsewhere [15]. Using the same human NPC, we set up the grafting into the lateral ventricle of mouse embryo (E17.5). Our results show that 2 weeks after their grafting, the cells are able to integrate within the brain parenchyma and start to migrate along known migratory pathways including cingulum bundle, corpus callosum, and fimbria (see Fig. 3a). At this early stage of post-grafting, a large number of cells remain close to the injection site. By contrast, the cells are found to be more dispersed after 1 month and in the process of integrating the distinct brain regions including the striatum (see Fig. 3a, b). Two months post-grafting, the cells start to

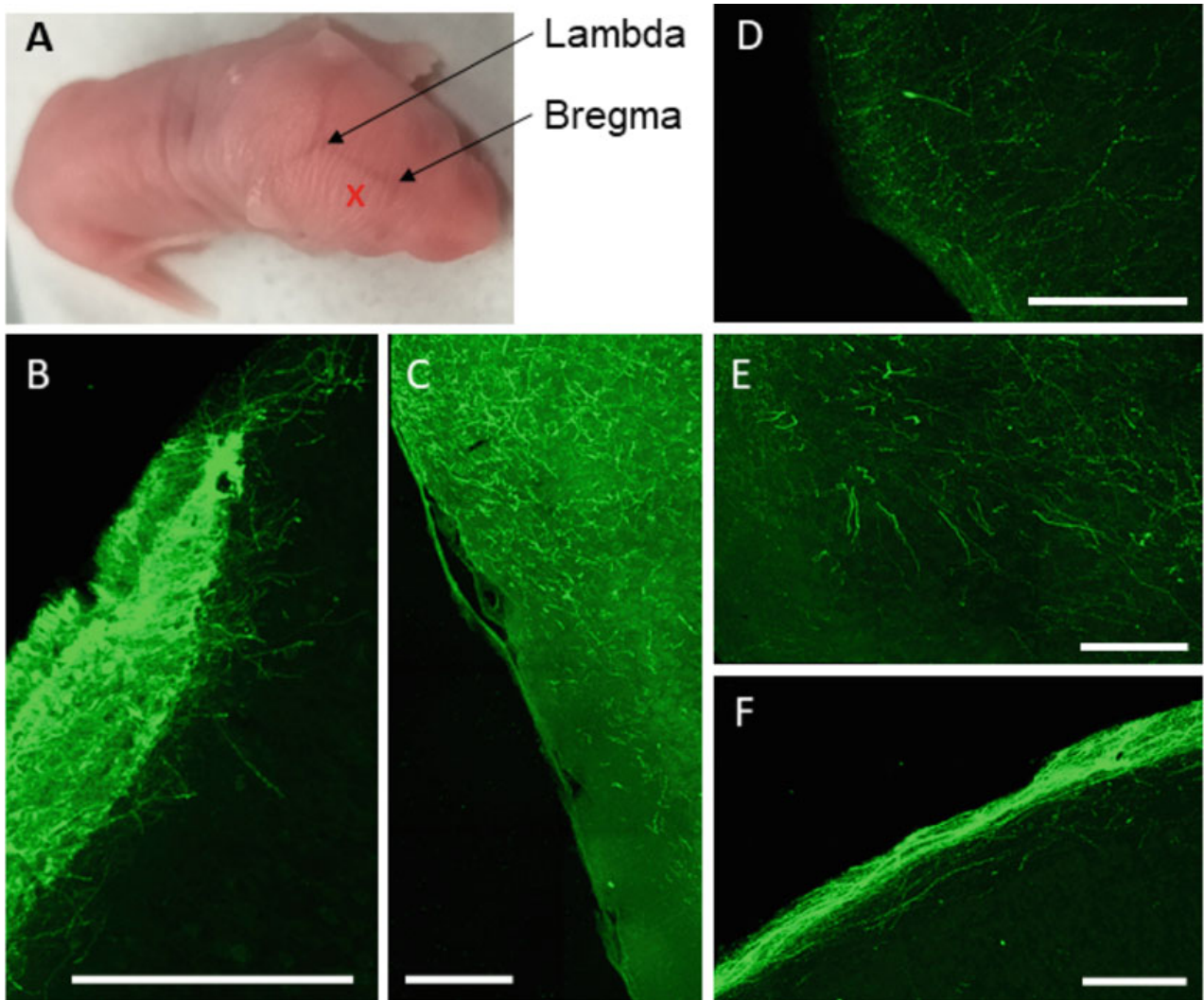


Fig. 2 Engrafting of human iPSC-derived NPC into the cortex of newborn mice. (a) Intracranial injection of human iPSC-derived NPC into the cortex of neonatal mice. The lambda and bregma landmarks are used to target the motor cortex as indicated in red. The injection site is located approximately 1 mm posterior to the bregma and 1 mm lateral to the sagittal suture, with 1 mm depth, as indicated by the red symbol. (b) Representative engraftments into the cortex of 50-day-old mice after neonatal injection of NPC. Graft location within the somatosensory cortex. Most of GFP-labeled neurons remain within the graft site, and extend their dendrites. (c) Axonal projections within the somatosensory cortex (bregma ≈ -0.955 mm). (d) Axonal projections in the somatosensory cortex (bregma ≈ 1.545 mm). (e) Long-range axonal projections in the retrohippocampal region (bregma ≈ -2.78 mm) (f) Long-range axonal projections in the somatosensory cortex (bregma ≈ -2.78 mm). Scale bars = 200 μ m

differentiate into excitatory cells (*see* Fig. 3c). At this stage, the co-localization of VGlut labeling with the human cells is observed both in neuronal cell bodies and projections (*see* Fig. 3c). Figure 4 illustrates the grafting of the human NPC into the dentate gyrus (DG) of adult immunodeficient mice, 3 weeks post-grafting. Our data show that cells can survive and integrate within the hippocampal structures following a stereotaxic injection in adult mice.

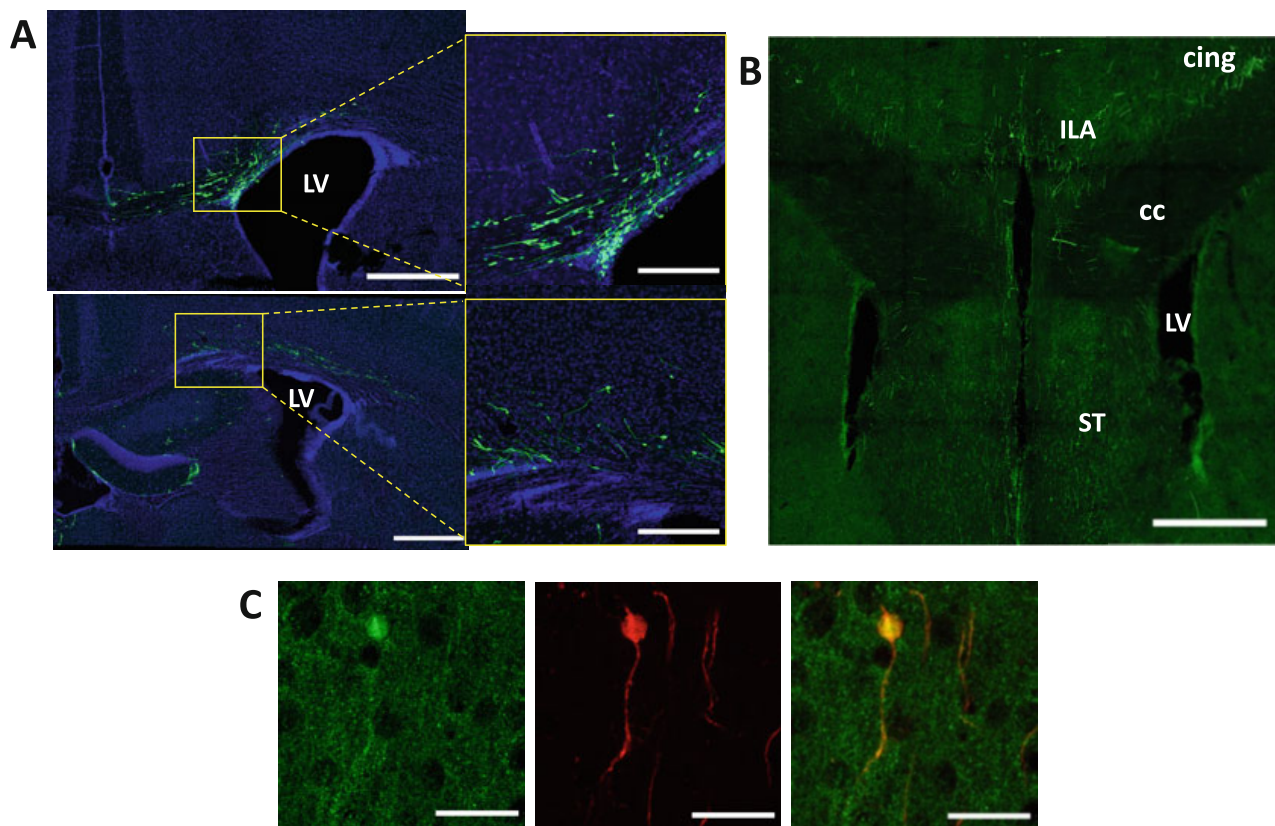


Fig. 3 Engraftment of human iPSC-derived NPC in utero, at different time points after transplantation. (a) Representative engraftments at 2 weeks post-transplantation (2 WPT) (bregma ≈ -0.1 mm) (upper panel) and at 1 month post-transplantation (1 MPT) (bregma ≈ -0.94 mm) (Lower panel). Graft core remains close to the lateral ventricle (LV) area. All pictures were taken using a $10\times$ objective. Scale bar of mosaic (left panel) = $500\ \mu\text{m}$ and scale bar of pictures (right panel) = $200\ \mu\text{m}$. (b) Projections of human NPC along different brain regions (*cing* cingulum bundle, *ILA* infralimbic area, *cc* corpus callosum, *ST* striatum area) at 3 MPT at $10\times$ magnification (scale bar = $500\ \mu\text{m}$). In green, GFP-labeled human NPC and in blue cell nuclei stained with DAPI. (c) Excitatory phenotype of grafted human NPC shown by VGLUT expression at $63\times$ magnification (scale bar = $30\ \mu\text{m}$), and at 2 MPT

4 Notes

1. The use of humanized chimeric mouse models allows the study of neuronal development and associated pathogenesis and neurodegenerative diseases using human cells in an *in vivo* condition. Under the experimental approaches described here, the neonatal grafting allows the grafted progenitors to predominantly differentiate into excitatory neurons which can mature, migrate, and project their axons in different brain regions. The iPSC technology has offered the possibility to study some specific phenotypes, including cell differentiation and maturation, neuronal morphology, and functional activities by electrophysiological recordings of cultured cells under *in vitro* conditions [4]. However, *in vitro* models using human iPSC-derived neurons are limited as they do not offer the possibility

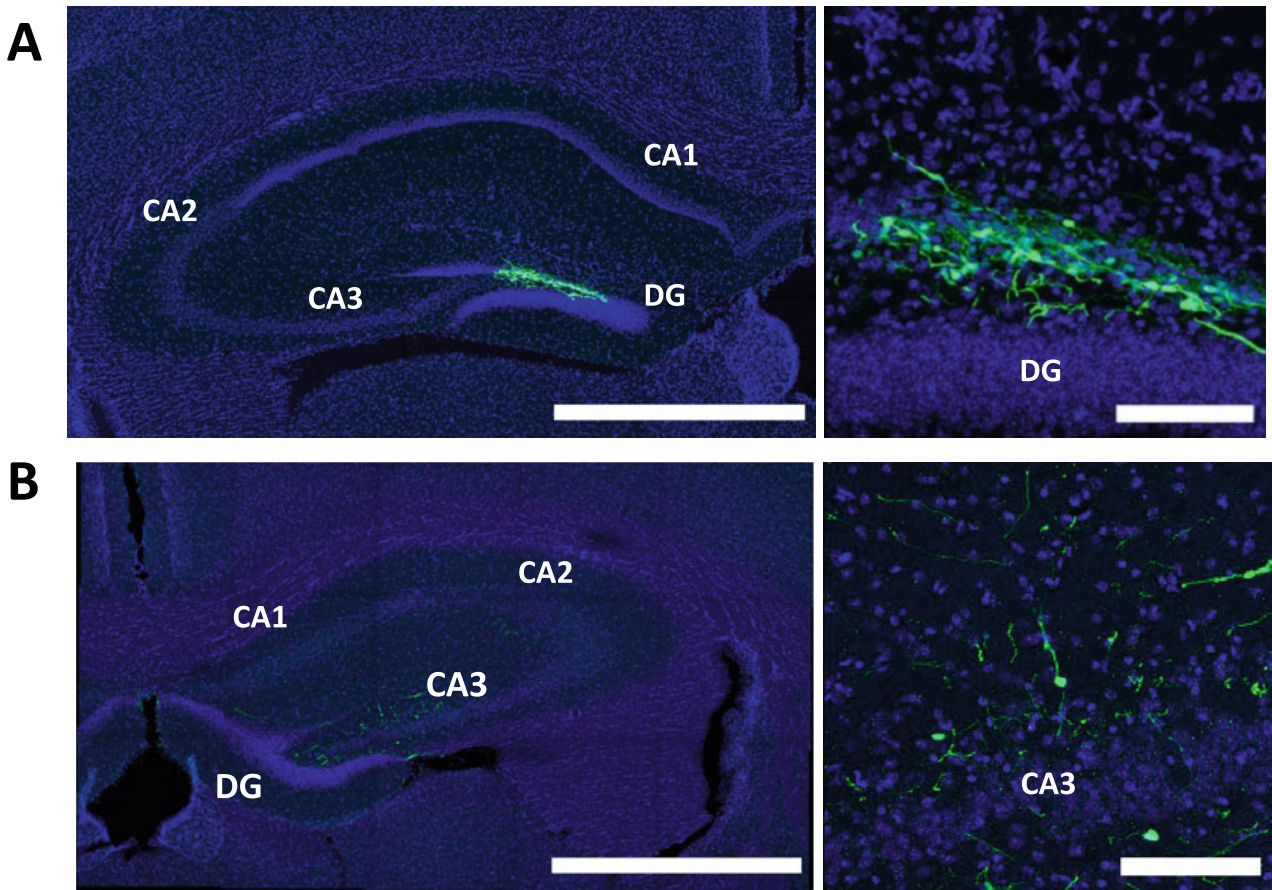


Fig. 4 Engraftment of human iPSC-derived NPC into the dentate gyrus (DG) of adult mice, at 3 weeks post-injection. Representative engraftments into the hippocampus area of NOD-SCID mice as shown by the graft core in the DG (bregma = -1.80 mm) (a) and projections (b) at low (left panel) and higher (right panel) magnifications. Low magnification mosaics are taken with a $10\times$ objective (scale bar = $1000\ \mu\text{m}$) and higher magnification pictures with a $20\times$ objective (scale bar = $100\ \mu\text{m}$). All pictures were acquired as a Z-stack with a confocal microscope to maximize the graft detection. In green, GFP-labeled human NPC and in blue cell nuclei stained with DAPI

to study disease pathogenesis at different stages of brain maturation within a such complex environment, and in the presence of external cues that are necessary for neuronal patterning. As shown in Table 1, the neonatal grafting of iPSC-derived neuronal progenitors has been successfully used by several authors. By comparing neonatal and in utero grafting, we observed that in both cases, the engrafted cells form initial clusters during the first month post-grafting which tend to remain over time, at least up to 7 months [12]. For neonatal grafting, it has been shown that grafted NPC appear to respond to region specific signals and are also responsive to neural patterning cues in vitro [4, 12, 41]. These human cells progressively expand and migrate in the murine forebrain. It has been difficult to understand to what extent the undifferentiated NPC or the immature neurons can integrate and recapitulate physiological neurogenesis in vivo. Moreover, most studies have been limited

due to the use of immunodeficient NOD-SCID mice, which have the tendency to form tumors at 7–8 months of age [49]. So far, these issues have not been considered for studying neurodevelopmental disorders. Interest has been focused on early stages of neuronal maturation, which has allowed the discovery of a panel of morphogenetic abnormalities that are linked to early development of neurons with ASD-associated mutations [15, 50]. It should also be noted that transplanted human PSC-derived NPC can be tumorigenic, if contaminated with residual pluripotent stem cells with sustained proliferation of residual stem cells [51]. As shown in Fig. 1, we used the SMAD inhibitor SB431542, based on previously reported studies [17], in order to avoid abnormal cell proliferation. For in utero grafting, we observed large densities of graft-derived fibers projecting into migratory pathways and in the host tissue as early as 15 days post-grafting (*see* Fig. 3). The in utero grafting method presents some advantages as it can be applied to immunocompetent mice with no graft rejection and no inflammation at injection sites (data not shown), while mouse neurogenesis continues which may favor further development of human cells.

Our results indicate that the cells can survive at least for 3 months after grafting and give rise to glutamatergic neurons (*see* Fig. 3). We also observed that they develop dendritic spines after neonatal grafting (data not shown), using the same GFP-labeled human iPSC line [15]. To our knowledge, there is no report on the in utero grafting of human iPSC-derived neuronal cells in rodent brain. The available data from using mouse embryonic cells grafted in the brain of rat embryos were analyzed within 7 weeks post-grafting [22]. However, human cells are expected to be found uniformly throughout the brain regions, including hippocampus, cerebral cortex, and striatum at later stages, up to 13 months, as observed in neonatally grafted mice [41]. Finally, we describe the grafting of NPC within hippocampus of the adult mice. This grafting method may help targeting a specific brain region, and to analyze more specifically how grafted cells can integrate within specific circuits. We illustrate this approach with NPC giving rise to excitatory neurons after grafting into the dentate gyrus of hippocampus. The same approach could be applied to interneurons that can be derived from human iPSC as well [40]. Interestingly, interneurons represent a large and diverse population of hippocampal neurons that are critical for information and memory processing. By grafting well-characterized mature interneurons, it is possible to identify more specifically how a specific human interneuron subtype may morphologically and functionally interact within the surrounding host cells.

2. Neurodevelopmental disorders are either due to various inherited mutations or acquired causal factors, and lead to dysfunction of brain development and cognitive deficits.

The pathogenesis of neurodevelopmental disorders has not been well elucidated, and no effective treatment has so far been found for these disorders. The establishment of accurate models which allow to investigate neurological disorders represents an important step toward better understanding and appropriate treatment of neurodevelopmental pathologies. To study the brain-associated diseases *in vitro* has been not possible, and to obtain the tissues from human brain represents a difficult alternative. The use of patient-derived iPSC, however, offers a unique opportunity to investigate pathological changes that may occur in the brain at early stages of neuronal development. In addition, human iPSC provide an auto-renewal source of cells which are identical to the donor [52]. Under the action of specific growth and transcription factors, they can differentiate into neurons of different phenotypes that are found within the six cortical layers, including excitatory and inhibitory neurons [53]. The grafting of iPSC-derived neurons into mouse brain offers the possibility to decipher cellular mechanisms in different temporal windows, from the neurogenic stages with undifferentiated cells to later stages of well-differentiated mature neurons, under control and pathological conditions. For genetic diseases, the iPSC from patients carry the genetic pattern of mutations from these donors and should display similar pathological and phenotypical changes. For autism spectrum disorders (ASD), recent studies have shown that the events underlying such disorders can occur during neonatal development, together with strong synaptic defects that are known to occur at later stages of development. In a previous *in vitro* study, we investigated the iPSC-derived pyramidal cortical neurons from patients with ASD carrying *de novo* heterozygous mutations in the postsynaptic SHANK3 protein. SHANK3 is a synaptic scaffolding protein located at the postsynaptic density of excitatory synapses [54]. The haploinsufficiency of SHANK3 gene provokes a developmental disorder known as the 22q13.3 deletion syndrome (or Phelan-McDermid syndrome). SHANK3 gene is also associated with pathogenesis and neuropathology of ASD, which involves synaptic dysfunctions and an imbalance in synaptic excitation/inhibition ratio. Using iPSC-derived neurons from ASD patients, we observed altered spinogenesis in all the patients who were included in the study [16]. In a subsequent study, we used the same cells from a control individual at precursor stages (NPC), and transplanted them into the cortex of newborn mouse brain [15]. We analyzed the integration of NPC, the maturation of the derived excitatory neurons, and their axonal projections

into the adult brain. We then co-transplanted the NPC from a control individual and from a patient carrying one *de novo* heterozygous mutation in *SHANK3*. In human neurons with the *SHANK3* mutation, we observed a reduction in cell soma size of selective neuronal populations and in axonal projections, as compared to control neurons, at 30 days post-transplantation. However, we did not observe any alteration in spinogenesis at this early stage, which are expected to occur at later stages of development. This indicates that *in vivo* models can recapitulate the early stages of the disease, which may help understand the initial mechanisms before the appearance of the well-described phenotypes observed in mouse models or in human cells kept in culture.

3. One of the strong aspects of our different grafting approaches is that humanized mouse models can be used for both neurodevelopmental and neurodegenerative diseases, depending on the stage at which the phenotypes of grafted cells are evaluated. At the early stages of development, regulation of cortical neurogenesis is very important as it is involved in neuronal fate [55]. For example, recent discoveries point out the permissive role of the amyloid precursor protein (APP) in the regulation of human cortical neurogenesis [56]. APP is also the precursor of β -amyloid peptide which can lead to progressive accumulation of β -amyloid oligomers, followed by their aggregation in amyloid plaques, one of the major hallmarks of the neurodegenerative Alzheimer's disease (AD). It would be possible to test whether the physiological functions of APP are related to the onset of AD, using *in vivo* approaches such as mouse chimeric models, xenografted *in utero* and appropriate genetic tools, to follow and control the production of endogenous APP within the whole brain or locally in specific brain regions. Humanized mouse models not only offer the possibilities to decipher the early events which underlie neuronal maturation and plasticity but also to investigate the pathological events that occur in the brain of patients with neurological disorders, including those with AD. Such models should also facilitate the preclinical evaluation of therapeutic measures and treatments as well as their consequences within the human neurons, *in vivo*. Finally, these models can help to set up appropriate transplantation therapies using neural stem cells. The xenografting strategies offer the possibility to compensate neural loss and neural tissue injury and should allow the discovery of therapeutic strategies for the future, in the context of both developmental disorders and degenerative diseases. One main challenge will be to face the complexity of human brain and consider its unique spatial and temporal development.

Acknowledgments

The authors are thankful to Dr. Alexandra Benchoua who performed the initial iPSC reprogramming. The “Fondation Recherche Alzheimer” provides the funding for CT’s PhD. The Pasteur-Paris University (PPU) international doctoral program provides the funding for MLP’s PhD. The French Ministry of Education and the LabEx BioPsy provided the funding for AV’s PhD. Other funding for this study were provided by grants from the French National Research Agency ANR (ANR-17-NEU3-0004; IPS BRAIN), from ERA-NET NEURON (iPSC & Brain), and from the “France Alzheimer” foundation. We gratefully acknowledge the UtechS Photonic Bioimaging (Imagopole), C2RT, Institut Pasteur, supported by the French National Research Agency (France BioImaging; ANR-10-INSB-04; Investments for the future).

References

1. Barbas H (2015) General cortical and special prefrontal connections: principles from structure to function. *Annu Rev Neurosci* 38:269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071714-033936>
2. De la Rossa A, Bellone C, Golding B et al (2013) *In vivo* reprogramming of circuit connectivity in postmitotic neocortical neurons. *Nat Neurosci* 16(2):193–201. <https://doi.org/10.1038/nn.3299>
3. Corti S, Faravelli I, Cardano M et al (2015) Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 10(6):3–15. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1037737>
4. Espuny-Camacho I, Michelsen KA, Linaro D et al (2013) Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits in vivo. *Neuron* 77:440–456. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.011>
5. Espuny-Camacho I, Michelsen KA, Linaro D et al (2018) Human pluripotent stem-cell-derived cortical neurons integrate functionally into the lesioned adult murine visual cortex in an area-specific way. *Cell Rep* 23:2732–2743. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.094>
6. Amunts K, Zilles K (2015) Architectonic mapping of the human brain beyond Brodmann. *Neuron* 88:1086–1107. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.12.001>
7. Molyneaux B, Arlotta P, Menezes et al (2007) Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev* 8:428–437
8. Jiang X, Wang G, Lee AJ et al (2013) The organization of two new cortical interneuronal circuits. *Nat Neurosci* 16(2):210–218. <https://doi.org/10.1038/nn.3305>
9. Lake BB, Rizi A, Kaeser GE et al (2016) Neuronal subtypes and diversity revealed by single-nucleus RNA sequencing of the human brain. *Science* 352(6293):1586–1590. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1204>
10. Martinez J, Rahsepar B, White JA et al (2017) Anatomical and electrophysiological clustering of superficial medial entorhinal cortex interneurons. *ENeuro* 4(5):ENEURO.0263-16.2017. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0263-16.2017>
11. Linaro D, Vermaercke B, Iwata R et al (2019) Xenotransplanted human cortical neurons reveal species-specific development and functional integration into mouse visual circuits. *Neuron* 104:972–986. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.10.002>
12. D’Alessio N, Koukoulis F, Blanchard S et al (2020) Long-term development of human iPSC-derived pyramidal neurons quantified after transplantation into the neonatal mouse cortex. *Dev Biol* 461:86–95. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.01.009>
13. Gouder L, Tinevez JY, Goubran-Botros H et al (2015) Three-dimensional quantification of dendritic spines from pyramidal neurons

- derived from human induced pluripotent stem cells. *J Vis Exp* 104:e53197. <https://doi.org/10.3791/53197>
14. Real R, Peter M, Trabalza A et al (2018) In vivo modeling of human neuron dynamics and Down syndrome. *Science* 362:eaau1810. <https://doi.org/10.1126/science.aau1810>
 15. Vitrac A, Pons S, Balkota M et al (2020) A chimeric mouse model to study human iPSC-derived neurons: the case of a truncating *SHANK3* mutation. *Sci Rep* 10:13315. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70056-4>
 16. Gouder L, Vitrac A, Goubran-Botros H et al (2019) Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying *de novo* *SHANK3* mutations. *Sci Rep* 9: 94. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36993-x>
 17. Boissart C, Poulet A, Georges P et al (2013) (2013) Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl Psychiatry* 3:e294. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.71>
 18. Mouilleau V, Vaslin C, Robert R et al (2021) Dynamic extrinsic pacing of the HOX clock in human axial progenitors controls motor neuron subtype specification. *Development* 148: dev194514. <https://doi.org/10.1242/dev.194514>
 19. Avale ME, Faure P, Pons S et al (2008) Interplay of $\beta 2^*$ nicotinic receptors and dopamine pathways in the control of spontaneous locomotion. *Proc Natl Acad Sci* 105(41): 15991–15996. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807635105>
 20. Nagashima F, Susuki IK, Shitamukai A et al (2014) Novel and robust transplantation reveals the acquisition of polarized processes by cortical cells derived from mouse and human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 23(18):2129–2142. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0966-2>
 21. Paxinos G, Franklin KBJ (2004) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Gulf Professional Publishing, pp 1–100. 012547640X, ISBN 9780125476409
 22. Brüstle O, Choudhary K, Karram K (1998) Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. *Nat Biotechnology* 16:1041–1044. <https://doi.org/10.1038/3481>
 23. Fricker RA, Carpenter MK, Winkler C et al (1999) Site-specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci* 19(14):5990–6005. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-14-05990.1999>
 24. Uchida N, Buck DW, He D et al (2020) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 97(26): 14720–14725. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14720>
 25. Ourednik V, Ourednik J, Flax JD et al (2001) Segregation of human neural stem cells in the developing primate forebrain. *Science* 293: 1820–1824. <https://doi.org/10.1126/science.1060580>
 26. Zhang S-C, Wernig M, Duncan ID et al (2001) In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature* 19:1130–1133. <https://doi.org/10.1038/nbt1201-1129>
 27. Goldstein RS, Drukker M, Reubinoff BE et al (2002) Integration and differentiation of human embryonic stem cells transplanted to the chick embryo. *Dev Dyn* 225:80–86. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10108>
 28. Chu K, Kim M, Chae SH et al (2004) Distribution and in situ proliferation patterns of intravenously injected immortalized human neural stem-like cells in rats with focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 50:459–465. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2004.08.015>
 29. Muotri A, Nakashima K, Toni N et al (2005) Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci* 102(51):18644–18648. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509315102>
 30. Tabar V, Panagiotakos G, Greenberg ED et al (2005) Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain. *Nat Biotechnol* 23(5):601–606. <https://doi.org/10.1038/nbt1088>
 31. Roy NS, Cleren C, Singh SK et al (2006) Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12(11):1259–1268. <https://doi.org/10.1038/nm1495>
 32. Aubry L, Bugi A, Lefort N et al (2008) Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proc Natl Acad Sci* 105(43):16707–16712. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808488105>
 33. Kriks S, Shim J-W, Pia J et al (2011) Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's

- disease. *Nature* 480:547–551. <https://doi.org/10.1038/nature10648>
34. Lamba DA, Gust J, Reh TA (2009) Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice? *Cell Stem Cell* 4:73–79. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.015>
 35. Kim D-S, Dongjin RL, Kim H-S et al (2012) Highly pure and expandable PSA-NCAM-positive neural precursors from human ESC and iPSC-derived neural rosettes. *PLoS ONE* 7(7): e39715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039715>
 36. Hargus G, Cooper O, Deleidi M et al (2010) Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci* 107(36):15921–15926. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010209107>
 37. Liu Y, Weick JP, Liu H et al (2013) Medial ganglionic eminence-like cells derived from human embryonic stem cells correct learning and memory deficits. *Nat Biotechnol* 31(5): 440–447. <https://doi.org/10.1038/nbt.2565>
 38. Nicholas CR, Chen J, Tang Y et al (2013) Functional maturation of hPSC-derived forebrain interneurons requires an extended timeline and mimics human neural development. *Cell Stem Cell* 12:573–586. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.005>
 39. Wakeman DR, Redmond DE, Dodiya HB et al (2014) Human neural stem cells survive long term in the midbrain of dopamine-depleted monkeys after GDNF overexpression and project neurites toward an appropriate target. *Stem Cells Transl Med* 3:692–701. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0208>
 40. Ahn S, Kim T-G, Kim KS et al (2016) Differentiation of human pluripotent stem cells into Medial Ganglionic Eminence vs. Caudal Ganglionic Eminence cells. *Methods* 101(2016): 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.009>
 41. Chen C, Kim W-Y, Jiang P (2016) Humanized neuronal chimeric mouse brain generated by neonatally engrafted human iPSC-derived primitive neural progenitor cells. *JCI Insight* 1(19):e88632. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.88632>
 42. Hsieh J-Y, Baraban SC (2017) Medial ganglionic eminence progenitors transplanted into hippocampus integrate in a functional and subtype-appropriate. *Manner* 4(2): e0359-16.2017 1–17. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0359-16.2017>
 43. Donegan JJ, Boley AM, Lodge DJ (2018) Embryonic stem cell transplants as a therapeutic strategy in a rodent model of autism. *Neuropsychopharmacology* 43:1789–1798. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0021-0>
 44. Ni P, Noh H, Shao Z et al (2019) Large-scale generation and characterization of homogeneous populations of migratory cortical interneurons from human pluripotent stem cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* 13:414–430. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.04.002>
 45. Upadhy D, Hattiangady B, Castro OW et al (2019) Human induced pluripotent stem cell-derived MGE cell grafting after status epilepticus attenuates chronic epilepsy and comorbidities via synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci* 116(1):287–296. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814185115>
 46. Ryu J, Vincent PFY, Ziogas NK et al (2019) Optogenetically transduced human ES cell derived neural progenitors and their neuronal progenies: phenotypic characterization and responses to optical stimulation. *PLoS ONE* 14(11):e0224846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224846>
 47. Southwell DG, Seifkar H, Malik R et al (2019) Interneuron transplantation rescues social behavior deficits without restoring wild-type physiology in a mouse model of autism with excessive synaptic inhibition. *J Neurosci* 40(11):2215–2227. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1063-19.2019>
 48. Xiong M, Tao Y, Gao Q et al (2021) Human stem cell-derived neurons repair circuits and restore neural function. *Cell Stem Cell* 28: 112–126. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.08.014>
 49. Santagonisto SF, Ricart Arbona RJ, Nashat MA et al (2017) Pathology of aging in NOD scid gamma female mice. *Vet Pathol* 55(5): 855–869. <https://doi.org/10.1177/2F0300985817698210>
 50. Kathuria A, Nowosiad P, Jagasia R et al (2017) Stem cell-derived neurons from autistic individuals with SHANK3 mutation show morphogenetic abnormalities during early development. *Mol Psychiatry* 23:735–746. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.185>
 51. Chung S, Shin B-S, Hedlund E et al (2006) Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation. *J Neurochem* 97(5):1467–1480. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03841.x>

52. Nestor MW, Phillips AW, Artimovitch E et al (2016) Human inducible pluripotent stem cells and autism spectrum disorder: emerging technologies. *Autism Res* 9:513–535. <https://doi.org/10.1002/aur.1570>
53. Van den Amele J, Tiberi L, Vanderhaegen P et al (2014) Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells. *Trends Neurosci* 34(6): 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.005>
54. Manoli DS, State MW (2021) Autism spectrum disorder genetics and the search for pathological mechanisms. *Am J Psychiatry* 178(1):30–38. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2020.20111608>
55. Villalba A, Götz M, Borrel V (2020) The regulation of cortical neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* 142., ISSN 0070-2153. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2020.10.003>
56. Shabani K, Pigeon J, Zariouh MBT et al (2021) The Amyloid Precursor Protein regulates human cortical neurogenesis. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.02.17.431707>

**ARTICLE 1 : Changement développementaux de progéniteurs
neuronaux humains greffés dans le système ventriculaire et le cortex
préfrontal de cerveau de souris in utero**

**Developmental Changes of Human Neural Progenitor Cells Grafted into
the Ventricular System and Prefrontal Cortex of Mouse Brain in Utero.**

Maria Llach Pou ^{1,2,†}, Camille Thiberge ^{1,2,†}, Michiel Van der Zwan ^{1,2}, Annousha Devi
Govindan ¹, Stéphanie Pons ¹, Uwe Maskos ^{1,2} and Isabelle Cloëz-Tayarani ^{1,2,*}

¹ Integrative Neurobiology of Cholinergic Systems, CNRS UMR 3571 “Genes, Synapses and Cognition”, Institut Pasteur, Paris, France.

² Sorbonne Université, Collège doctoral, Paris, France.

[†] These authors contributed equally.

[§] Corresponding author: isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

Article

Developmental Changes of Human Neural Progenitor Cells Grafted into the Ventricular System and Prefrontal Cortex of Mouse Brain in Utero

Maria Llach Pou ^{1,2,†} , Camille Thiberge ^{1,2,†} , Michiel Van der Zwan ^{1,2}, Annousha Devi Govindan ¹ ,
Stéphanie Pons ¹, Uwe Maskos ^{1,2} and Isabelle Cloëz-Tayarani ^{1,2,*}

¹ Institut Pasteur, Université Paris Cité, Unité de Neurobiologie Intégrative des Systèmes Cholinergiques, CNRS UMR 3571 “Gènes, Synapses et Cognition”, 25 Rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

² Collège Doctoral, Sorbonne Université, 75005 Paris, France

* Correspondence: isabelle.cloez-tayarani@pasteur.fr; Tel.: +33-(0)1-45-68-88-04

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The transplantation of neural progenitors into a host brain represents a useful tool to evaluate the involvement of cell-autonomous processes and host local cues in the regulation of neuronal differentiation during the development of the mammalian brain. Human brain development starts at the embryonic stages, in utero, with unique properties at its neonatal stages. We analyzed the engraftment and differentiation of human neuronal progenitor cells (hNPCs) transplanted in utero into the mouse brain. The influence of the environment was studied by transplanting human NPCs within the lateral ventricles (LV), compared with the prefrontal cortex (PFC) of immunocompetent mice. We developed a semi-automated method to accurately quantify the number of cell bodies and the distribution of neuronal projections among the different mouse brain structures, at 1 and 3 months post-transplantation (MPT). Our data show that human NPCs can differentiate between immature “juvenile” neurons and more mature pyramidal cells in a reproducible manner. Depending on the injection site, LV vs. PFC, specific fetal local environments could modify the synaptogenesis processes while maintaining human neurogenesis. The use of immunocompetent mice as host species allows us to investigate further neuropathological conditions making use of all of the engineered mouse models already available.

Keywords: xenografting; in utero transplant; human stem cells; human-induced pluripotent stem cells; chimeric mouse models; brain development; brain disorders



Citation: Llach Pou, M.; Thiberge, C.; Van der Zwan, M.; Devi Govindan, A.; Pons, S.; Maskos, U.; Cloëz-Tayarani, I. Developmental Changes of Human Neural Progenitor Cells Grafted into the Ventricular System and Prefrontal Cortex of Mouse Brain in Utero. *Cells* **2023**, *12*, 1067. <https://doi.org/10.3390/cells12071067>

Academic Editor: Nina Graffmann

Received: 26 January 2023

Revised: 6 March 2023

Accepted: 29 March 2023

Published: 31 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Experimental models of the human brain are needed for a better understanding of its development and the cellular and molecular dysfunctions that can occur during different stages of neuronal development, leading to autistic disorder, Asperger’s disorder, childhood disintegrative disorder, Rett’s disorder, and pervasive developmental disorder, and also other brain disorders such as schizophrenia, dementia, and Parkinson’s disease. There has been a significant progress in the field of human stem cells in recent years, with the main objective of reproducing the landmarks of neuronal disorders in vivo and decipher the altered underlying mechanisms in a context that resembles pathophysiological conditions. The development of stem cell transplantation models using human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) is also expected to offer new advances for regenerative medicine purposes, with the possibility of using specifically the allogeneic sources of these cells to produce autografts without the need for immunosuppression [1,2]. However, such clinical translations are still premature and more difficult to explore and adapt for therapeutic purposes. A large number of pre-clinical studies have already demonstrated the capacity for neuronal transplants to integrate within rodent brains and respond to guiding molecules

and signals, under in vivo conditions [3,4]. In addition, it has been shown that transplanted pyramidal neurons derived from human embryonic stem cells can be specifically directed toward their appropriate sites of differentiation and maturation [5,6]. So far, the neuronal xenotransplants which have been obtained from hiPSCs include human neurospheres [7], human neuronal progenitor cells (hNPCs) [8,9], purified hiPSC-derived neurons with defined phenotypes [5,10], and, more recently, human brain organoids [11–13]. In parallel, experimental conditions have been set up which allow the integration of xenotransplants as single neurons within the mouse cortex where they can develop morphologically and functionally with a prolonged maturation period similar to that of the human developing brain [14]. Under such conditions, the transplanted neurons reach a more advanced stage of dendritic spine maturation as compared to those reported previously [15,16]. Therefore, the host brain seems to provide a permissive environment and the adapted cues for spinogenesis and synaptogenesis. In light of earlier reports, the transplantation paradigm used in conditions which allow the transplanted neurons to integrate as single cells represents a key determining factor during the final stages of the maturation and connectivity of these neurons within the host brain.

A major obstacle facing the transplantation of hiPSC-derived cells is the observed rejection of the grafts by the immune system of the host. Consequently, most transplantation models consist of grafting human cells into the brain of immunodeficient animals. The short-term immunosuppressive method allows for immunological tolerance with a significant improvement in the integration of transplanted iPSCs [17]. However, to increase the survival of transplanted cells, current methods are predominantly based on the use of transgenic immunodeficient rodent models. The brain is thought to possess an “immunological privilege” with a relatively large degree of permissible mismatching between the donor and the host [18–20]. In general, the main immune processes that occur during graft rejection involve the natural immunity of the host, which corresponds to the immune responses that naturally exist prior to transplantation. Some of these responses include the production of antibodies by B1 and B lymphocytes, mainly during the first weeks of life [21–23]. However, only the natural antibody of the IgG class can cross the barrier of placenta to assure fetal immunity [22,24]. Since innate responses are necessary to trigger the adaptative immune responses, some of the host immune responses cannot be fully active at the late embryonic stage or even at the early neonatal stages [24].

In the present study, we described a human neuronal-chimeric mouse by transplanting hNPCs into the brain of immunocompetent mice at the embryonic stage in utero. Our aim was to develop a new approach which prevents graft rejection and avoids bias due to the usage of immunodeficient mouse models. We specifically grafted NPCs within the mouse lateral ventricles at an embryonic stage at which only a small number of lymphocytes can infiltrate during brain development [25]. We used our previously characterized and established hiPSC-derived NPCs [9–26] to study some of the key morphological parameters at cellular levels at early stages of neuronal development. We showed that grafted neuronal precursors in the ventricles move towards their target regions during the first months following transplantation. When grafted into the embryonic neocortex at the same stage, we observed that these precursors integrated directly in the cortical areas with a more advanced maturation profile.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design and Ethics Statement

All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. This protocol was approved by the Institut Pasteur Ethics Committee and the French “Ministère de l’Education Nationale, de la Recherche et de l’Innovation” under reference APAFiS #25221. Pregnant Swiss OF1 mice (Charles River Laboratories) were habituated at the animal facility for at least 3 days and surgeries were performed at the embryonic stage of E17.5.

2.2. Production of hiPSC and Their Derivation into hNPCs

The production of hiPSCs, their characterization, commitment to the neural lineage, and derivation of stable NPCs were performed according to Boissart et al. [27]. For this study, we used a control cell line from Coriell Biorepository (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA), the GM04603 (<https://www.coriell.org/Search?q=GM04603>, accessed on 25 January 2023) provided by Dr Alexandra Benchoua (I-Stem Institute, Evry) together with the derived NPCs [27]. For the initial experiments, we used the WTSli002-A line (<https://cells.ebisc.org/WTSli002-A/>, accessed on 25 January 2023, Wellcome Trust, UK), as described in a previous study [28]. For the data presented here, we selected those obtained with the GM04603 iPSC line which has been fully characterized in vitro and in vivo in our previous studies [9,26,27].

The T25 flasks were coated under the flow hood with poly-ornithine (15 µg/mL in sterile H₂O). After an overnight exposure at 37 °C, the flasks were washed three times with H₂O. Then, the flasks were coated with laminin (1 mg/mL), diluted to 1/1000 in Advanced DMEM F12 medium, and incubated for at least 4 h at 37 °C. The NPCs were then plated at the density of 50,000 cells/cm² in 5 mL of culture medium. The composition of the culture medium is described in Table S1 and prepared as previously described [9]. After the removal of the culture medium, fresh N2B27 medium containing 5 µL/mL of fresh laminin solution was added to keep the neurons attached and to avoid clumping. The medium was changed every 3 days. For the in vivo transplantation into the mouse embryos, we used hNPCs derived from the GM04603.

2.3. Culture and Amplification of NPCs before Transplantation

The culture and amplification of NPCs were performed in sterile conditions. For their labeling, NPCs were transduced with a CMV-GFP-lentiviral vector to obtain green fluorescence, as described previously [9,29]. Lentiviral vectors were prepared according to a published protocol [30]. The map of the CMV vector is detailed in Figure 1A. Briefly, NPCs were thawed in T75 flasks at a density of 50,000 cells/cm² in 25 mL of NPCs medium supplemented with Rock Inhibitor Y27632 (10 µM). The NPCs were transduced with 99.5 ng of lentivirus (p24) in a 6-well culture plate filled with 500 µL of fresh culture medium for 3 h. The volume was completed to 2 mL, incubated for the next 48 h, and then rinsed with the culture medium. All media and products are described in Thiberge, Llach Pou et al. [31] and are summarized in Table S1.

2.4. In Utero Transplantation of Mouse Embryos

Before their transplantation, the cells were kept in a water bath at 37 °C. The injection solution also contained 20 mM EGTA to avoid cell aggregation upon transplantation [14,31,32]. The transplantation protocol has been previously detailed [31]. Briefly, 2 µL containing 2×10^5 cells were injected within 1 lateral ventricle or within 1 side of the PFC of E17.5 embryos. The injection within LV is depicted in Figure 2A and the injection within PFC was described previously using mouse neonates (P0-P1) [8,9]. Thirty minutes before surgery, buprenorphine (0.05 to 0.1 mg/kg) was injected subcutaneously at the back of the neck of the pregnant mouse for initial analgesia. The pregnant mouse was then anesthetized with isoflurane and oxygen and placed on a heating pad connected to the anesthesia unit. A drop of ocril gel was applied on each eye. The abdomen was shaved locally for ventral laparotomy and lidocaine gel was applied locally before and after the laparotomy. A sterile towel drape was positioned on the mouse abdomen. An incision of 1 to 1.5 cm was made in the lower abdomen in a manner to cut both the skin and the thin fascia layer. The whole uterus was carefully extracted from the abdomen. During surgery, drops of sterile PBS kept at 37 °C were consistently applied on the exposed fetuses. The sharp glass pipette was carefully inserted through the fetal skull, and cells were injected into each fetus, except the first one to be delivered on each uterine horn (Video S1). After the injection, the pipette was carefully withdrawn. Then, the uterus was reentered into the abdominal cavity. The peritoneal cavity was rehydrated with 0.5 to 1 mL of sterile PBS to replace any fluid loss

during the surgery. Then, the incision was closed with two types of sutures: for fascia and skin, we used sterile resorbable sutures (Prolene™, EH7471, Ethicon, LLC, Issy les Moulineaux, France) and non-resorbable sutures (Coated Vicryl, V302, Ethicon, LLC), respectively. After the surgery, the pregnant mouse was positioned on a warming pad until the mouse was fully awake. Analgesia treatment (acetaminophen 4 mg/20 mL) was administered in the drinking water for 3 to 5 days after the surgery. Hydrogel was also given to the mice for one day after the surgery. We could observe that the presence of EGTA significantly reduced the cell aggregation and increased the possibility of identifying single cells within the mouse brain, as described previously [14].

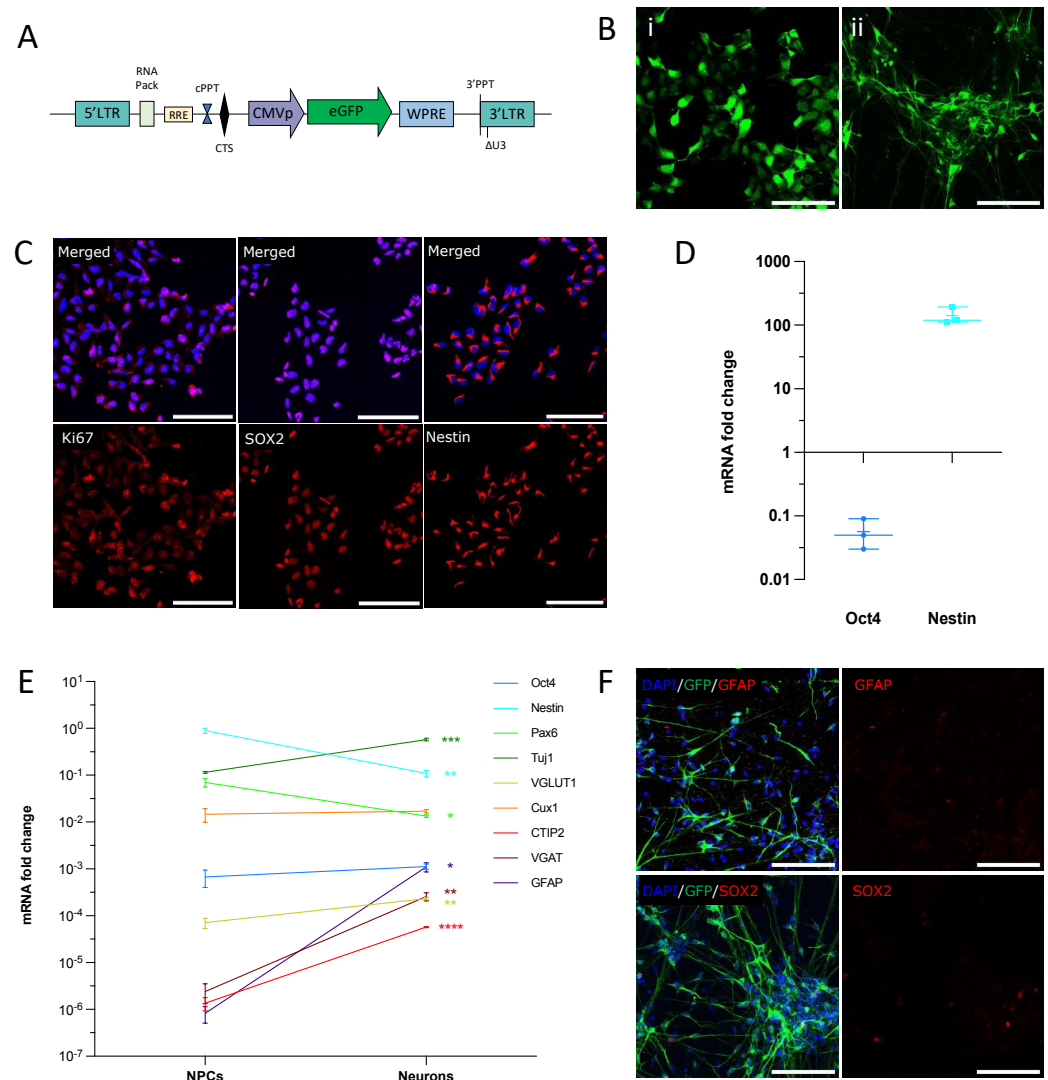


Figure 1. NPCs differentiate into immature cortical neurons in vitro. (A) Lentiviral construct expressing GFP used for NPCs labeling, adapted from [9]. (B) GFP is expressed in NPCs (left panel) and 30-day-old neurons (right panel). Scale bar = 100 μ m. (C,D) NPCs express the neuronal progenitor markers Ki67, SOX2, and Nestin at passage 28 (C). The plot (D) shows mRNA expression fold-change as compared to human fetal brain. qPCR results were normalized to GAPDH and calculated with the Δ CT method (data are from three independent cultures). (E) mRNA relative expression of differentiation markers at NPCs and neuronal stage. Data are expressed as fold change to GAPDH calculated with the Δ CT method (* $p < 0.05$; ** $p < 0.002$; *** $p < 0.0002$; **** $p < 0.0001$, unpaired t -test). (F) Neurons do not express the astrocyte marker GFAP. Only a small proportion of cells remained SOX2 positive after 30 days of differentiation. Scale bars = 100 μ m.

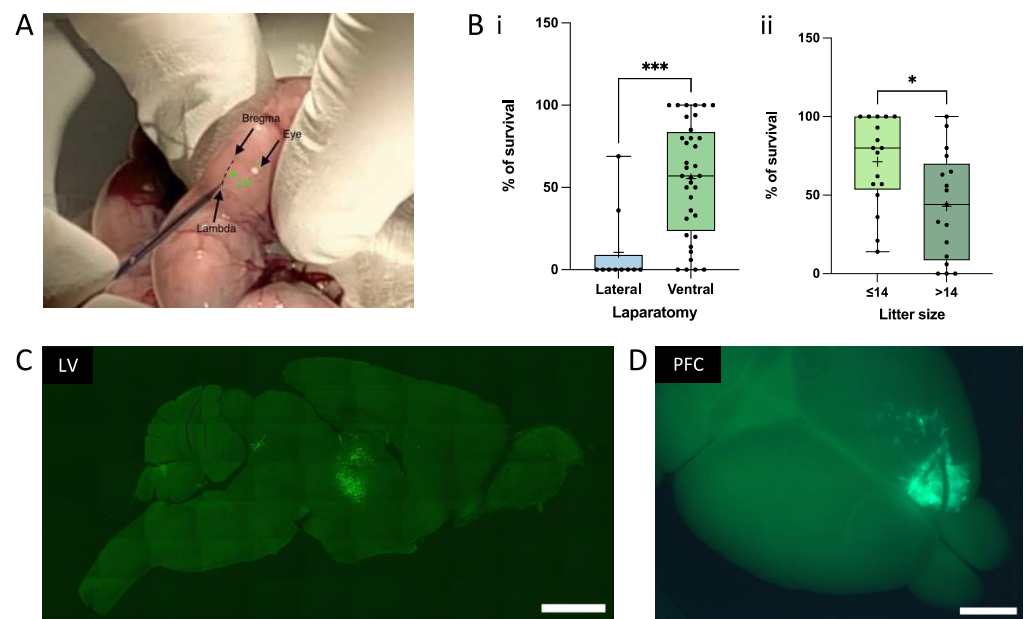


Figure 2. The in utero technique. (A) Illustration of the site of injection for Lateral Ventricle (LV) surgery. (B) Pup survival as a function of the laparotomy technique (Bi) and litter size (Bii). Pup survival is higher when the ventral laparotomy is performed on mice that have less than 14 embryos. Each point of the boxplot corresponds to the survival percentage in one litter. (* = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$, unpaired t -test). (C) Sagittal picture of a brain section at 1 MPT into LV taken with an epifluorescence microscope. Cells are labeled with GFP. (D) Illustration of a graft within the PFC at 1 MPT taken with an epifluorescence macroscope. Scale bars = 2 mm.

2.5. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

The total mRNA from NPCs and neuronal cultures was extracted with the RNeasy Plus Mini Kit (ref. 74034, Qiagen). cDNA was generated using the High Capacity cDNA Retro-Transcription Kit, according to the manufacturer's instructions (Ref. 4368814, ThermoFisher). For mRNA expression level quantification, real-time PCR was performed on the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. UDG activation (1 cycle, 2 min, 50 °C) and polymerase activation (1 cycle, 10 min, 94 °C) were followed by 40 cycles of denaturation (15 s, 95 °C) and anneal/extend (1 min, 60 °C). The PCR reactions contained 500 nM of each primer, 0.5 × PowerUP SYBR Green Master Mix (2×) (A25742, Applied Biosystems), and 20 ng of cDNA in a final volume of 10 µL. The primers were manually designed to amplify mRNA only (at least one of the primer pairs spans the exon-to-exon junction). The list of primers is presented in Table S2. The specificity of the primers was verified with a melting curve and agarose gel electrophoresis of the PCR confirmed amplicon size. The mRNA expression level was expressed as the fold change to the housekeeping gene GAPDH (Figure 1E) using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method or normalized to GAPDH and compared to a control condition using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Figure 1D) [33].

2.6. Immunofluorescence (IF)

Immunofluorescence analysis on brain sections was performed at 1 and 3 MPT, according to our previously described protocol with slight modifications [9,31]. Animals received a lethal dose of a mixture of Ketamine (Imalgene®, 100 mg/kg, Merial) and Xylazine (Rompun®, 10 mg/kg, Bayer), and were transcardially perfused with 15 mL of DPBS, followed by 40 mL of ice-cold paraformaldehyde (PFA) (4%) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The brains were dissected and post-fixed overnight at 4 °C in 4% PFA. In total, 40 µm coronal sections were obtained using a microtome (Leica SM2010 R), collected in 12-well culture plates, and stored in DPBS + Azide (0.02%) at 4 °C until use. The free-floating sections were rinsed twice in PBS (pH 7.4) and then incubated in a DPBS solution

containing 0.2% Triton X-100 and 10% goat or horse serum at room temperature (RT) for 30 min to block nonspecific binding. An extra step of blocking using MOM (Ready Probes™ Mouse on Mouse IgG Blocking Solution (30×), R37621, Invitrogen) was added if a mouse primary antibody was used. The primary antibodies, diluted in blocking solution, were added overnight at 4 °C. The list of all antibodies and their dilutions is presented in Table S3. An additional incubation with DAPI diluted in PBS was performed for 10 min at room temperature [29].

2.7. Mapping and Semi-Quantification of Cell Bodies and Projections

Fluorescence images of whole brain slices were captured using a laser-scanning confocal microscope (Axio Scan.Z1, Inverted LSM 700 from the Histology Platform at Institut Pasteur). Three different tile images at 20× magnification from three independent transplanted animals were taken per condition and analyzed by two distinct experimenters. To overcome the limits of conventional manual counting of labeled cells, we implemented a novel analysis pipeline allowing for the reconstruction of the expected shape of each brain slice (Figure S1). This method reduces any bias in brain mapping that may result from slight variations of slicing conditions along the anterior-posterior axis of the brain. This pipeline allows the precise mapping of single neuron positions and projections by automatically setting a grid of squares of ~500 µm². The Allen Brain Atlas was used as a reference for the precise matching of experimental brain slices with the expected brain cartography. A grid of squares was applied to each section and the cells were manually counted. Semi-quantification of the cell bodies and projections was performed, and color codes were applied. To avoid bias due to possible graft heterogeneity, we selected brains with similar grafting for all quantifications.

2.8. Quantification of Dendritic Spines

We reported a protocol for the imaging of dendritic spines after immunofluorescence in a video journal [29]. Briefly, confocal images were acquired with a confocal laser-scanning microscope (LSM 700, Zeiss) using a 40× oil NA = 1.3 objective, and a 488 nm laser for GFP excitation. A Z spacing of 200 nm was used for Z-stack acquisitions. A semi-automatic tracing of dendrites and automated segmentation of spines was performed using the Filament Tracer module of Imaris 9.5 software (Bitplane AG, Zürich). The spine categories were defined by their morphology as follows: Stubby: length < 1 µm; Mushroom: max-width-head > min-width-neck*2; Thin: length (spine) < 2 and mean-width-head ≥ mean-width-neck; Filopodia-like: length ≤ 4 µm and >1 µm, by the MATLAB, version 2022a. Spines were quantified at a 20 µm distance from the soma [34]. The 3D images and videos (.mp4 files) of spines were obtained from Z-stacks of confocal images and processed using the animation functions in Imaris software to zoom and navigate around the dendrites and spines. For LV transplantation, we did not include hNPC-derived neurons that were present in matter tracts or present in non-neuronal environments, but quantified only those present in cortical areas.

2.9. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Version 9 software (GraphPad, San Diego, CA, USA) and are reported in each figure legend. Confidence levels of 95% were used.

3. Results and Discussion

3.1. hNPCs Differentiate into a Homogeneous Population of Immature Neurons In Vitro

For this study, we used a well-characterized human iPSC line for which derived hNPCs were GFP-labeled, as we described previously [9,26,29]. We did not exceed the number of cell passages that could have altered the NPCs' amplification and proliferation [10]. We first checked that these cells could differentiate into a homogeneous population of cortical neurons in vitro, as we have shown previously. Our data indicate that human

NPCs and hNPC-derived neurons express similar levels of green fluorescence (GFP), with a more mature shape after 30 days of *in vitro* differentiation (Figure 1A,B). The hNPCs displayed positive immunoreactivity for the cortical radial glial markers SOX2 and Nestin, and for the proliferation marker Ki67 (Figure 1C). The mRNA level of OCT4, a marker for undifferentiated cells, was decreased when compared to the fetal brain, while Nestin mRNA was increased (Figure 1D). Only a few cells expressed SOX2 in the cultures of 30-day-old neurons (Figure 1F), indicating successful neuronal differentiation. Figure 1E presents the comparative expression of differentiation (CTIP2, Oct 4, Pax 6, and Nestin), neuronal (VGLUT1, VGAT, Tuj1, Cux1), and astrocytic (GFAP) markers in NPCs and neuron stages. mRNA was measured by RT-qPCR and the levels were normalized to GAPDH. The Nestin mRNA levels decreased in the 30-day-old neurons, as compared to the NPCs, while those for Oct 4 remained very low. The expression of CTIP2, the vesicular GABA transporter (VGAT), TUJ1, GFAP, and, to a lesser extent, Cux1 were increased in neurons as compared to NPCs (Figure 1E). CTIP2 is a transcription factor expressed in the cortical layers V–VI neurons, which has also been linked to axonal growth and the establishment of the cellular architecture of the striatum, *in vivo* [35,36]. VGAT, the vesicular GABA transporter, has been shown to play a role in the embryonic development [37]. Although our protocol provides a large majority of excitatory cells [27], we cannot exclude some VGAT expression during the earlier stages of neuronal differentiation. In parallel, we did observe higher levels of VGLUT1 mRNA as compared to VGAT, in NPCs and similar levels in neurons. A slight increase in VGLUT1 mRNA was also found in neurons as compared to NPCs. Tuj1 is a marker of neuronal lineage, expressed at early stages of maturation as well as in mature neurons. This is in accordance with a slight increase in its expression in neurons, as compared to NPCs. The GFAP mRNA levels were increased in neurons, but this increase was not correlated to the increase in protein levels since no GFAP could be detected at the same stage of neuronal maturation (Figure 1F). In accordance with Boissart et al. [27], Cux1 mRNA was higher than CTIP2 mRNA in both conditions. As expected for more mature neuronal cells, Pax6 and Nestin expressions were slightly decreased in the neurons as compared to the NPCs.

3.2. *In Utero* Grafting of Human iPSC-Derived NPC into Embryonic Mouse Brain

The xenotransplantation of neural progenitors represents a very useful method to study the contribution of the intrinsic mechanisms and their dynamic crosstalk with the host factors that control and regulate cell migration and differentiation within the developing brain [38]. The regional determination of neural progenitors is an early event, which is still ongoing at the stage of E17.5 [39]. During the course of this study, we first aimed at demonstrating that human NPCs could integrate, differentiate, and migrate after their transplantation into the E17.5 mouse brain, *in utero*. For that purpose, we used experimental conditions which allow the human precursors to integrate as single cells, which will, in turn, result in a coordinated morphological and physiological development of their dendritic spines similarly to our previously reported observations in neonatal xenotransplantations [14]. In order to target the earlier stages of development, we set up a technique which allows for the *in utero* transplantation of NPCs into the LV and PFC embryonic regions. We first compared the percentage of pups' survival between lateral and ventral laparotomy and observed that ventral laparotomy was the most adapted method, at least in the case of large litters, such as those expected with Swiss OF1 mice (Figure 2Bi). The percentage of pups' survival was also significantly increased when the litter did not exceed 14 pups (Figure 2Bii). Figure 2C illustrates that a large number of cells can survive and integrate into the periventricular areas, as well as the whole ventricular system, including the third ventricle, when grafted into the LV, as shown at 1 MPT (left panel). Figure 2D also shows a direct view of an *in utero* transplant within the PFC, as shown at 1 MPT (right panel). The scanned cortical transplant can be observed directly within the transplanted hemisphere. This would allow the exclusion or rejection of any abnormal transplant before further analysis. Regardless of the mechanisms that may be involved locally, these initial

observations indicate that progenitor cells are able to survive and integrate within distinct brain regions.

3.3. Achievement of a Stable Cell Engraftment Using Immunocompetent Mice and Maturation Pattern of Axonal Projections up to 3 MPT

According to our differentiation protocol, we expect hNPCs to differentiate mainly into glutamatergic pyramidal excitatory neurons, morphologically characterized *in vivo* by a conical “tear-shaped” soma, an apical dendrite, and basal spiny dendrites. Pyramidal neurons can extend their axon at long distances from the cell body. It has recently been shown that axons can also originate from dendrites in mammals and in humans to a lesser extent [39]. Under our experimental conditions, we could not detect any axon arising from dendrites. Detailed mapping of somas and axonal projections originating from ventricular transplants are depicted in Figures 3 and 4. hNPCs were transplanted *in utero* within the mouse LVs. The distributions of cells and their projections were quantified independently by two (somas) and three (projections) observers, as described in the experimental procedures section. The integration of GFP-labeled cells, their survival, maturation, and phenotypic fate over time was followed up to 3 MPT. The transplants did not increase the brain surface, nor did they remain confined within the LV. We could easily identify GFP+ neurons within different mouse brain regions with a typical pyramidal morphology (Video S2; Figure 4). The semi-quantitative analysis at 1 MPT and 3 MPT indicates the presence of variable densities of GFP+ projections within distinct brain areas. Many GFP+ projections were detected within the brain structures close to the external walls of the lateral and third ventricles. As we were able to observe at different levels of the host brain, the GFP+ projections reached their highest densities in the corpus callosum, septum, caudate putamen, hippocampus, and thalamic nuclei. The projections were distributed both ipsi- and contralaterally to the same extent at 3 MPT (Figure 3). These findings are in accordance with those reported previously after *in utero* grafting of mouse neurons into the embryonic rat brain [40]. The two hemispheres are connected by commissural fiber systems, including the corpus callosum and hippocampal commissures, which were enriched in axonal projections (Figure 3). The two LVs are separated from each other by a thin vertical sheet [41] but they communicate with the third LV in which projections were also found (Figure 3). Perpendicular projections could also be detected between the ventricular wall dorsal to the CA1 hippocampal brain region of the host. GFP+ projections were also detected to a lesser extent in the cortex and the subcortical areas, including the hippocampus and thalamus (Figure 3). The pattern of projections was slightly different from that we previously observed under ventricular transplantation in neonates [9]. More precisely, we did not observe any visible axonal projections along the rostral migratory stream, nor the presence of cells within the olfactory structures. This indicates that under *in utero* grafting conditions, the NPCs endogenously predisposed to become excitatory cells did not significantly follow the same pathways promoting the migration of interneurons to olfactory structures. Espuny-Camacho et al. reported a widespread distribution of cell projections [5]. However, the distribution of GFP-labeled cell bodies has not been fully investigated in xenotransplantation studies with human iPSC-derived neurons. This may be due to the fact that a precise quantification of GFP-labeled cell bodies within a specific brain structure requires volumetric analysis among several transplanted brains. It should also be noted that small variations in the cell location and integration at the embryonic stage could lead to larger variations in the adult brain. It should be noted that assessing the number of grafting cells would require the use of the same grafted brain for analysis at different time points, which is not technically possible by standard methods. Such quantifications have not been reported so far. One of our objectives for this study was to determine the capacity of cells to survive upon their *in utero* transplantation, while keeping their migratory properties over time. Despite some variabilities among the three independent brains which were analyzed, we observed similar patterns of cell distributions in the regions close to the ventricular system at 1 MPT (Figure 4). At 3 MPT, the transplanted

cells displayed the properties needed to migrate into more distant regions, which include lateral and medial septum, caudate putamen, retrosplenial, motor and anterior cingulate cortex, hippocampus, some thalamic nuclei, and preoptic areas (Figure 4). Similar patterns were observed among the 3 brain samples which were evaluated independently at 1 MPT and 3 MPT. During neuronal migration, NPCs are expected to adapt their migration and final location by following well-known migratory pathways [42]. Our results indicate that at least some of the intrinsic migratory properties of human cells remain unchanged while they develop in the murine host in a similar manner among independent transplanted mice. Our data also indicate that the number of GFP+ cells remained similar between 1 MPT and 3 MPT in 3 independent experiments and according to the quantification of 3 brain sections per region and brain (Figure 4).

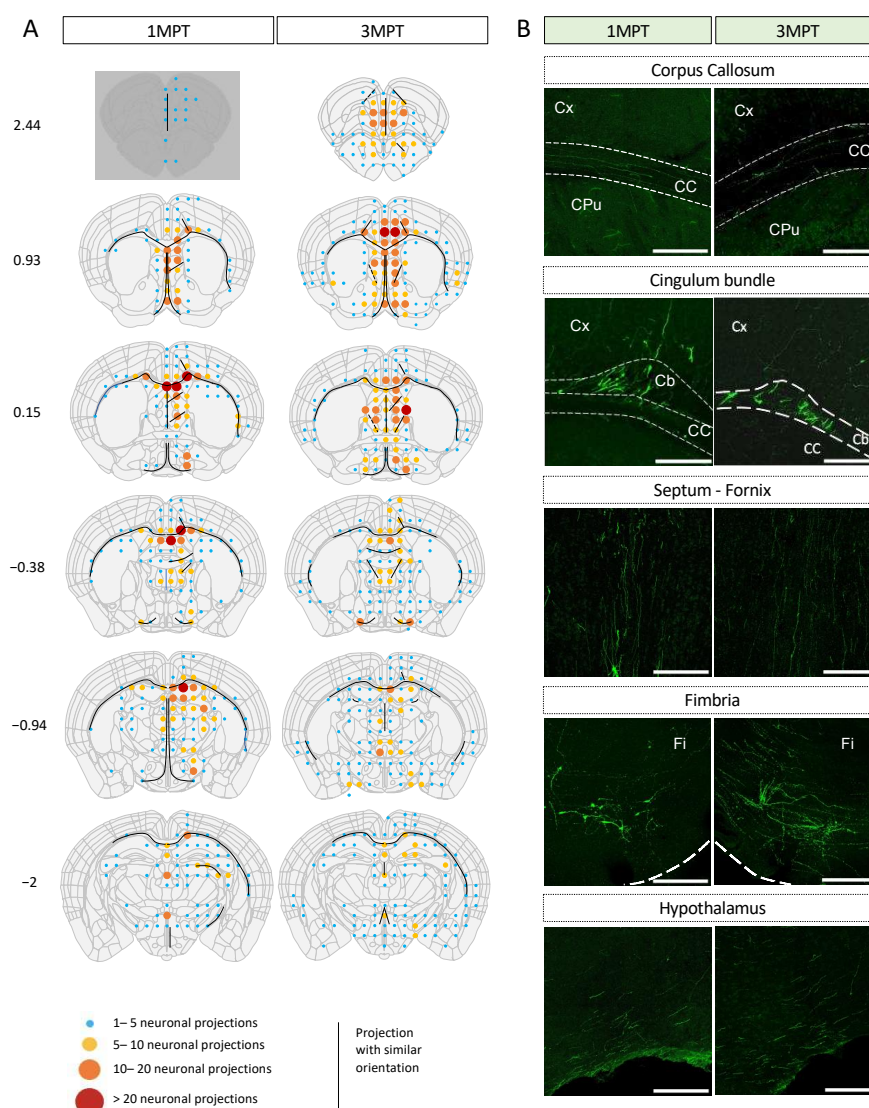


Figure 3. Mapping of neuronal projections from transplanted human cells within the LV of the embryonic mouse brain at 1 MPT and 3 MPT. (A) Camera lucida drawings are according to Allen Brain Atlas (<https://mouse.brain-map.org/>, accessed on 25 January 2023). Image credit: Allen Institute. The densities of neuronal projections are depicted using a code-color schematic representation. Results are calculated as the mean value from three independent mice. Two to three brain sections were analyzed for each coordinate (Bregma, indicated in mm) and per mouse. (B) Representative images of GFP+ projections at 1 MPT and 3 MPT in fiber tracks and brain regions such as the cortex (Cx), corpus callosum (CC), cingulum bundle (Cb), septum/fornix, fimbria (Fi), and hypothalamic region. The illustrated data are from the three representative brains. Scale bars = 200 μ m.

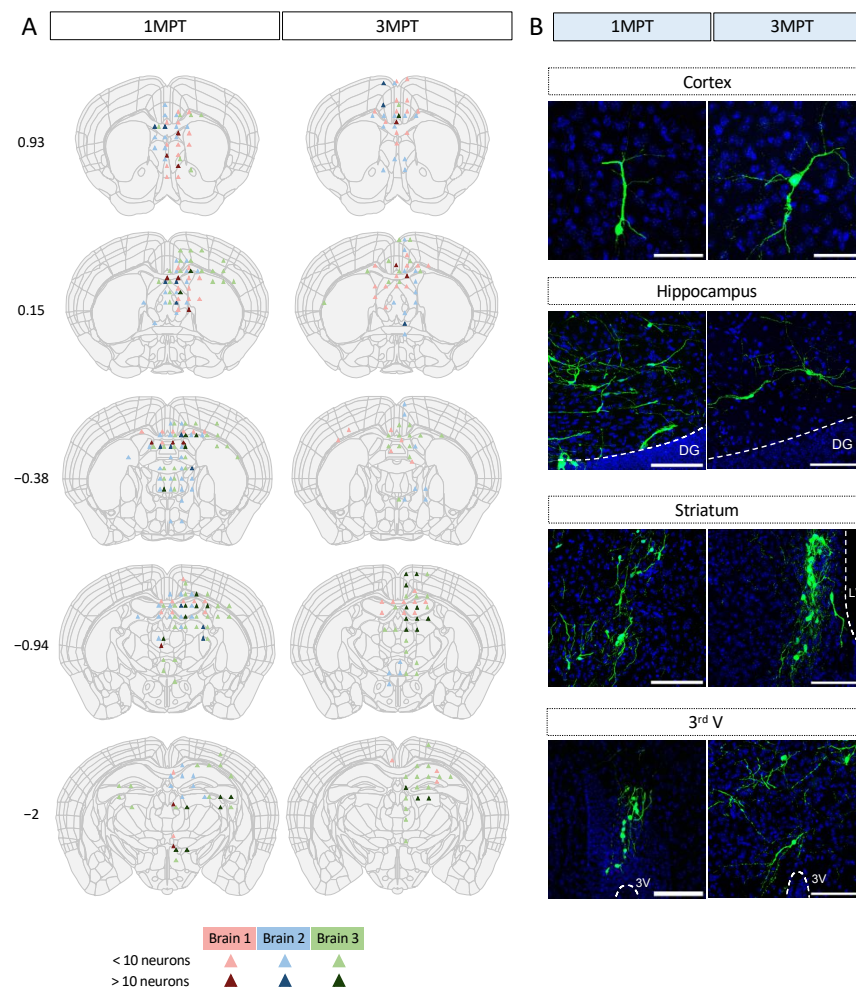


Figure 4. Mapping of neuronal somas from transplanted human cells within the LV of the embryonic mouse brain at 1 MPT and 3 MPT. **(A)** Camera lucida drawings are according to Allen Brain Atlas (<https://mouse.brain-map.org/>, accessed on 25 January 2023). Image credit: Allen Institute. Two brain sections were analyzed for each coordinate (Bregma, indicated in mm) and per mouse. Each brain analyzed is represented in a different color and the number of neuronal somas is represented in a color-code manner. For each brain and coordinate, 40- μ m thick images were used and the counted values summed. **(B)** Representative images of brain regions where the grafted human cells tended to migrate.

In contrast to previous studies, we did not observe any significant graft rejection at 1 MPT despite the use of an immunocompetent host, as previously observed by other authors [43]. We, therefore, believe that under our experimental conditions, human-transplanted cells might express some specific antigens at least prior to the maturation of the mouse immune system, thereby preventing the rejection of a transplant by the host immune system. Additionally, it has been reported that iPSC-derived NPCs display low immunogenicity [44]. More recently, immature neural precursors have also been reported to partially suppress the proliferation of murine CD4 and CD8 T cells involved in the adaptative immune responses [43]. Such adaptative immune responses are under the control of the host natural immunity which is not fully active at late embryonic or even at early neonatal stages [24]. Since the brain has been considered immunologically to be a privileged organ [44,45], these findings could provide further explanations and help understand the reasons for the absence of graft rejection in our experiments.

3.4. Analysis of Human Cell Neuronal Phenotypes after in Utero Transplantation at 3 MPT

During brain development, specific neuronal subtypes are produced in a specific temporal manner. The protocol we used for the derivation of human NPCs into cortical pyramidal neurons was adapted from Boissart et al. [27]. It allows the NPCs to differentiate into large proportions of excitatory neurons ($\cong 80\%$), mainly from the cortical layers II–IV, and, to a lesser extent, into GABAergic cells ($\cong 20\%$) in vitro. Using the immunostaining approach, there was an absence of SOX2 and GFAP labeling of human cells after in utero transplantation at 3 MPT, and in LV and PFC conditions. We did not observe any SOX2 or GFAP expression in the differentiated cells in these conditions (Figure 5A–C, Video S3). Our data are consistent with those obtained in vitro (Figure 1) and indicate that human cells have lost their capacity to proliferate without differentiating into astrocytes at 3 MPT after LV and PFC transplantation. It has been previously shown that sequential mechanisms may exist and confer young neurons to differentiate into astrocytes [46]. Therefore, one cannot exclude some derivation of human cells into astrocytes at later stages of neuronal differentiation as we could observe in vitro at 40–45 days of differentiation using the same iPSC line together with two other iPSC lines [26]. We analyzed the expression of the neuronal nuclear marker NeuN, a selective marker of postmitotic neurons. We could not clearly identify isolated mature neurons that co-expressed NeuN and GFP at 3 MPT after LV transplantation and in all of the neuronal migration brain subregions (Figure 5A). By contrast, NeuN was clearly expressed in the human NPC-derived pyramidal cells after PFC transplantation, as illustrated in Figure 5C. As a marker for glutamatergic neurons, we selected the vesicular glutamate transporter VGLUT1, which is expressed in all of the neuronal migration brain regions [47]. We could detect the expression VGLUT1 in NPC-derived neurons after LV and PFC transplantation at 3 MPT. The 3D reconstruction and zoomed-in visualization of dendrite segments and spines allowed us to demonstrate at a microscale the colocalization of VGLUT1 with GFP labeling (Figure 5B–D). We could observe that VGLUT1 was only expressed at the levels of dendritic shafts after LV transplantation but also at the spine levels after PFC transplantation (Figure 5D; Videos S4 and S5). We also analyzed the expression of the oligodendrocyte marker Olig2 and did not detect any colocalization of Olig2 with GFP labeling (Figure 5A,C). For analysis of progressive cell death over time, we tested the expression of apoptosis-related caspase-3 protein at 1 MPT and 3 MPT (Figure S2). Our results did not show any significant caspase-3 labeling at the two time points. To evaluate the maturation of the transplanted cells between LV and PFC transplants, we analyzed the differential expression of the NeuN marker for mature neurons with that of $\beta 3$ -tubulin, a marker of the early phases of neuronal differentiation (Figure S3). Our results strongly suggest higher levels of neuronal maturation with increased glutamate levels neurotransmission in human NPC-derived neurons transplanted in PFC, as compared to those transplanted in LV.

Microglia have been described as a regulator of the proliferation of neural precursors cells in the developing cerebral cortex [48]. They play a role in synaptic pruning and synaptic density and can rapidly detect changes in the brain environment [49,50]. Using single-cell and spatial transcriptomic profiling, it has been recently shown that the neuronal identity can influence microglia densities [51]. During the course of this study, we analyzed the potential enrichment of mouse microglia at transplantation sites at 1 MPT and 3 MPT after LV and PFC transplantations. For this purpose, we used Iba1 labeling to identify the presence of microglia cells at injected and non-injected hemispheres (Figure 6). Interestingly, we could observe differences in microglia labeling under all of the conditions tested. The number of Iba1+ cells remained within the same order between the injected and non-injected sites in LV transplantation at both 1 MPT and 3 MPT. A slight decrease in cell numbers was observed in the non-injected site, where the transplanted cells are expected to be less present, at least at 1 MPT (Figure 6). As compared to LV, the PFC transplantation induced higher levels of Iba1+ cells, initially surrounding the transplanted area at 1 MPT, and then integrating within the transplanted area at 3 MPT. In the PFC region, the level of resident microglial cells was twice higher as high as that of the LV region. These

observations are in agreement with previous reports on the regional heterogeneity of microglia within specific brain regions, among rodent brains [52]. We also analyzed the morphology of microglial cells as an index of their reactivity [53]. The small cell somas and large territories occupied correspond to a lower activity state, while cell body enlargement and more irregular cell shape correspond to a high activity [54]. After LV transplantation, we did not observe any significant variation between 1 MPT and 3 MPT, and between the ipsilateral and contralateral sites (Figure 6). After PFC transplantation, we observed a slight increase in the soma areas between 1 MPT and 3 MPT, and between the injected and non-injected sites. Microglia are expected to regulate the survival of neuronal cells without excluding a possible phagocytosis of dead cells and debris that may result during PFC transplantation, where the high densities of human cells may influence their glial environment. Further studies are needed to examine and confirm this hypothesis.

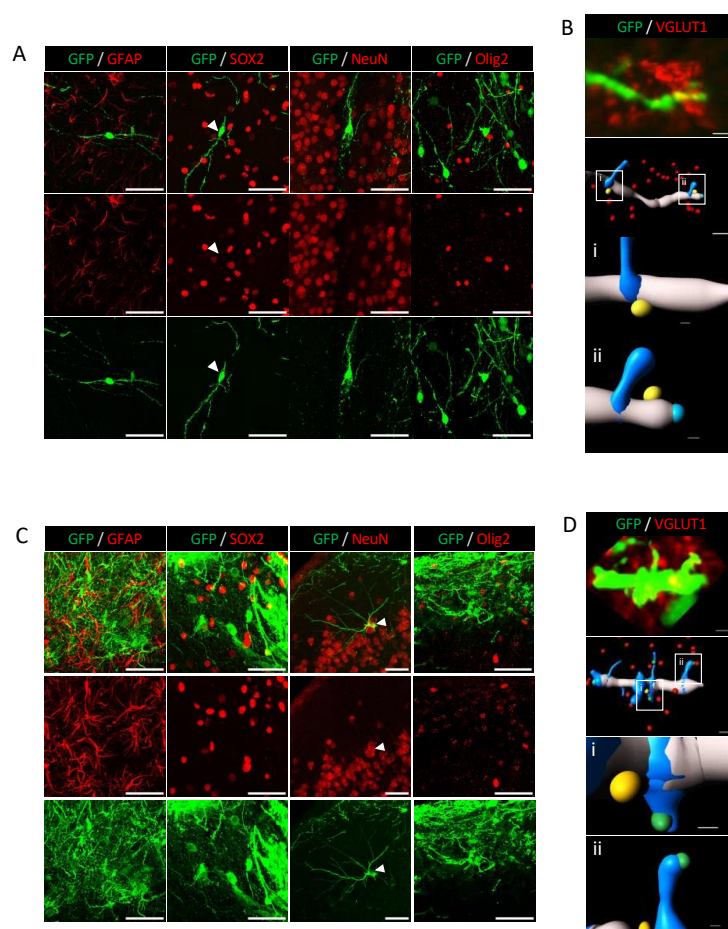


Figure 5. NPCs differentiate into glutamatergic neurons at 3 MPT. Immunofluorescence staining of NPC-derived neurons by GFAP, SOX2, NeuN, and VGLUT1 at 3 MPT after LV (A,B) and PFC (C,D) transplantation. Left to right panels, no positive human cells were found for GFAP, Sox2, NeuN, and Olig2 (no double-labeled cells). (B). Punctiform labeling of dendritic segment was observed for VGLUT1, clearly illustrated by a 3D zoomed-in image showing distinct VGLUT1 punctae represented in yellow (Bi, Bii). (C). Left to right panels, no positive human cells were found for GFAP, Sox2 and Olig2. Positive labeling for NeuN marker showing the nuclei of pyramidal neurons within the PFC (arrowhead). (D). Punctiform labeling of dendritic segment and associated spines was observed for VGLUT1, clearly illustrated by a 3D zoomed-in image showing distinct VGLUT1 punctae represented in yellow (dendrite) and green (spines) (Di, Dii). Scale bars = 50 μ m (GFAP, SOX2, NeuN and Olig2 images), scale bars = 2 μ m (reconstituted VGLUT1 images), and scale bars = 0.3 μ m (zoomed images Bi, Bii, Di, Dii).

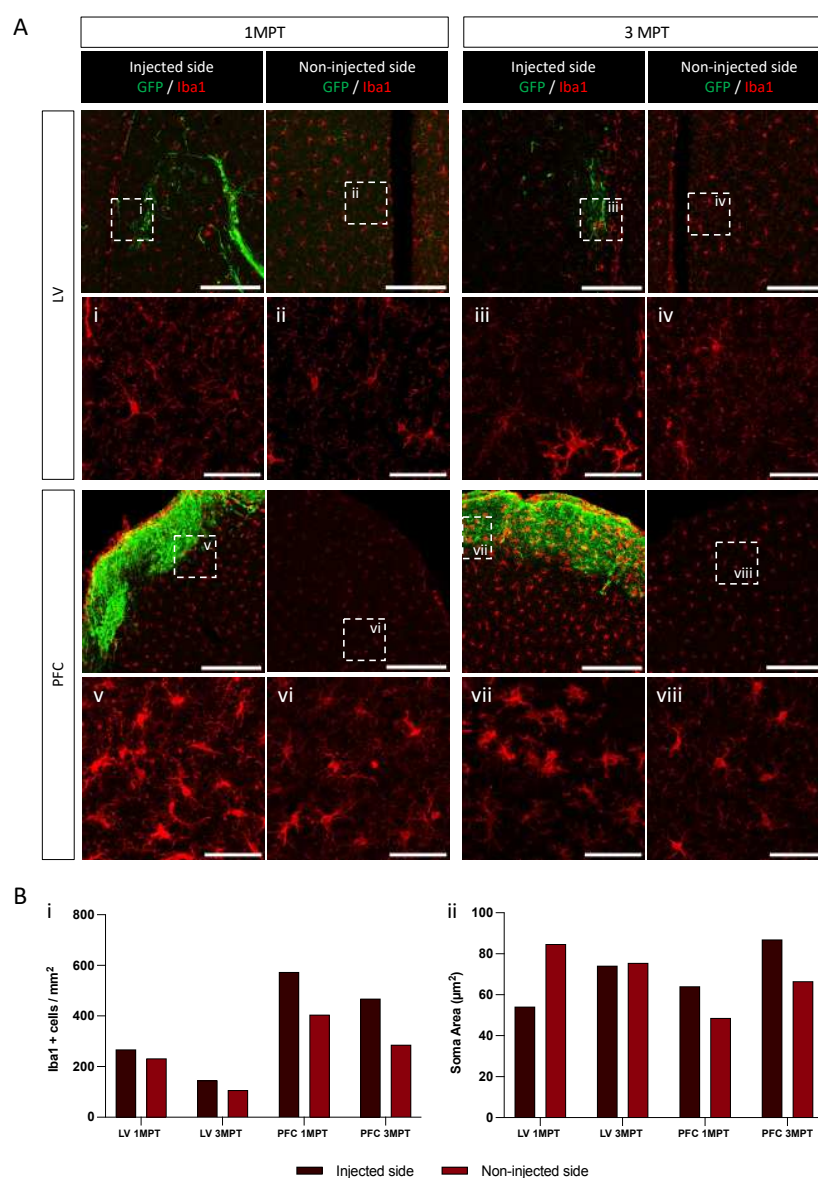


Figure 6. Microglia recruitment around the grafted area, related to Figure 5. **(A)** Confocal images at 1 MPT and 3 MPT of the injected and non-injected sides for LV- and PFC-transplanted mice. The transplanted cells are labelled with GFP, and microglia is shown in red. Pictures i–viii show the higher magnification of the area for the analysis of microglia morphology on one representative brain for each condition. Scale bar = 200 μm and 5 μm for i–viii. **(B)** Plot showing microglial density (Bi) and soma area (Bii) for each condition. Quantification was performed on the 20× images, using the MorphoLibJ plugin in Fiji.

3.5. Comparative Analysis of Dendritic Spines in LV- or PFC-Transplanted Human Cortical Pyramidal Neurons

Dendritic spines are important for the establishment of most excitatory synapses and the cortical circuits. Their density and structural plasticity are thought to directly reflect the glutamatergic synaptic transmission and synaptic plasticity in the brain cortex during development, as well as the developed adult brain. Each spine may allow the neuron to control its local activity. The aim of this study was to understand the contribution of the local host environment in spinogenesis processes. Our objectives were to compare the spine maturation in human cortical pyramidal neurons derived from transplanted NPCs at 1 and 3 MPT after their in utero engraftment into the LV of the mouse embryo (E17.5); and the spine maturation after transplanting the human NPC into two distinct embryonic regions,

namely the LV and the PFC, at 1 and 3 MPT. For these experiments, we used our previously reported method, which consists of the 3D reconstruction and quantitative analysis of diverse structural spine parameters on iPSC-derived pyramidal neurons [9,29] (Figure 7A; Video S6). The set of morphological parameters that have been measured in our study are depicted in Figure 7B. The diverse morphologies of dendritic spines have been reported previously with the classical distinction between filopodia, thin, stubby, and mushroom forms [54]. The spine diversity appears to be directly related to its stability and functional activity [54]. Figure 7C illustrates the proportion of the four spine categories, tested under each experimental condition. We could observe a large proportion (90%) of filopodia at 1 MPT after LV transplantation. The proportion of filopodia at 1 MPT was lower in PFC as compared to the LV transplants but remained in the major spine category (57.9%). This indicates that spines at this stage are still immature. The NPCs have moved forward to the cortical zones, and this may be the reason for the delay in the maturation process. In contrast to filopodia, the stubby and mushroom categories have been recently shown to possess a post-synaptic density with similar average protein copy numbers and topologies [55]. At 3 MPT we observed that the proportion of stubby and mushroom spines increased in the LV transplants, while only the proportion of stubby spines increased in the PFC transplants (Figure 7C). These data indicate an increase in the level of maturation until 3 MPT. We could also observe a significant increase in the total spine densities at 3 MPT compared to 1 MPT after transplantation of the NPCs into LV and PFC, with an even higher increase in the PFC-transplanted neurons compared to LV. Such increases were more pronounced for the filopodia and stubby than for the thin and mushroom categories (Figure 7D). The spine densities were very similar to those we reported previously in neonatal grafting [9], as well as those reported in a recent study using human-transplanted organoids [13]. By contrast, the total volume of spines remained unchanged over the four conditions tested. At 3 MPT, a slight but significant decrease in the relative spine head volume was observed in the PFC transplants compared to the LV transplants. This effect was predominantly observed for the filopodia spines (Figure 7D). Our results also indicate that the spine straightness and neck morphologies remained unchanged in all of the tested conditions, despite a slight decrease in the spine neck length between 1 MPT and 3 MPT in the LV transplants (Figure 7D). The total spine length was significantly lower in PFC as compared to LV at 1 MPT. We also observed a 38% increase in the total spine head volume together with a 37% decrease in the total spine neck length after transplantation within the LV. These data strongly suggest that a coordinated regulation of the neck morphology and synaptic maturation could occur and be linked to functional neuronal maturation [54]. Finally, we measured the morphological parameters of the dendrites from human cortical pyramidal neurons. While the dendrite length remained unchanged between all of the conditions tested, we could observe a significant increase in the dendrite diameter and dendrite volume, as well as the number of primary branching points at 3 MPT, when the NPCs were transplanted in the PFC compared to the LV (Figure 7E). In addition, the dendrite volume was significantly increased between 1 MPT and 3 MPT in the PFC transplants (Figure 7E). Altogether, our data show a higher complexity of dendritic arborization of the cortical pyramidal neurons when directly transplanted within the PFC compared to the LV. In parallel to higher dendritic complexity, higher spine densities were predominantly observed, while the spine intrinsic characteristics remained similar between the PFC and LV. Neuronal maturation represents a continuous process that is under the influence of local and extrinsic factors, which may affect cell migration and maturation. At the level of the LV transplants, the human-transplanted NPCs have migrated and adopted some specific trajectories toward the cortical zone before reaching a cortical destination. For the PFC-transplanted NPCs, the local and extrinsic factors were expected to increase the neuronal maturation while keeping the neonatal human phenotypes, which signifies that the xenografted cortical neurons are expected to retain some juvenile traits in adult mice [5,56].

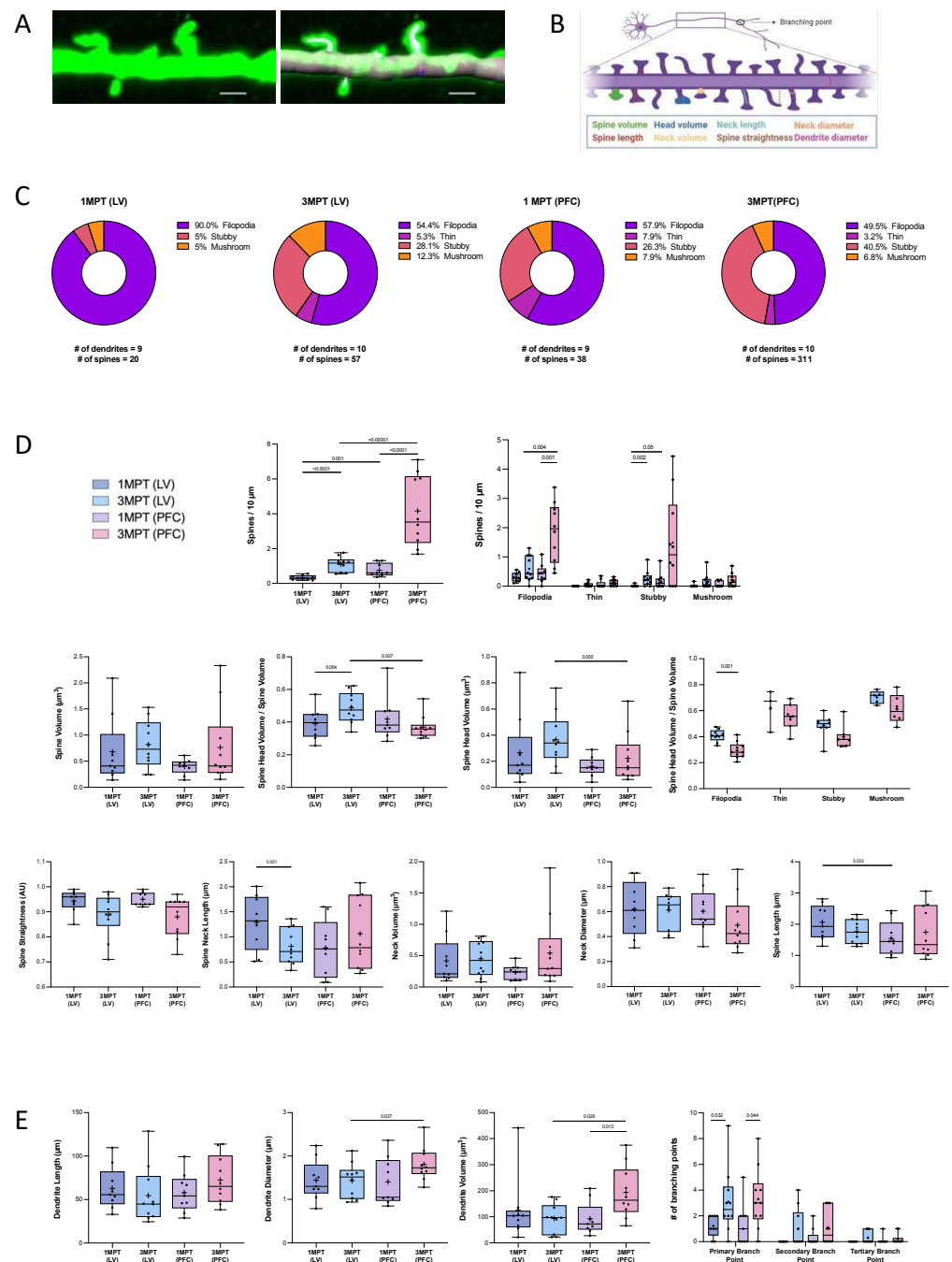


Figure 7. Quantitative analysis of spine and dendrite morphology in LV- and PFC-grafted NPCs at 1 MPT and 3 MPT. (A) Confocal image at 3 MPT of a pyramidal cell dendrite grafted in the PFC before (left) and after dendrite and spine reconstruction with the Imaris 9.5 software (right). (B) Schematic representation of the parameters evaluated. Created by BioRender. (C) Pie charts showing the distribution of the different spine categories at 1 MPT and 3 MPT in LV- and PFC-transplanted cells. Spines were classified into four different classes: filopodia, thin, stubby, and mushroom. Percentages were calculated over the total number of spines in all of the analyzed dendrites. In total 8, 8, 7, and 6 neurons, and 3, 3, 2, and 2 mice were used for 1 MPT-LV, 3 MPT-LV, 1 MPT-PFC, and 3 MPT-PFC, respectively. (D) Measurement of spine densities and spine morphology parameters. (E) Measurement of dendrite morphology parameters. Data are presented using a box and whiskers graph with plotted “min” and “max” and median values. Mean values are also indicated as “+”. Each dot represents a dendrite and spine. Spine parameters were averaged per dendrite. Statistical analyses were performed using Mann-Whitney test.

4. Conclusions

Our data show that human neural precursors transplanted into the brain ventricles of embryonic immunocompetent mice can survive and differentiate into juvenile-like (not fully mature) and more mature neurons with specific patterns of migration and axonal projections over time with no abnormal proliferation, which we found reproducible and uniform among all the transplanted mice. We evaluated the functional neuronal differentiation using a detailed 3D analysis of synaptogenesis. Depending on the injection site, LV vs. PFC, we discovered that the specific fetal local environments significantly modified the synaptogenesis processes while maintaining human neurogenesis. We are currently analyzing the molecular determinants of such processes at the level of transcriptome using single-nuclei RNA sequencing. Our in utero approach can be extended and applied in future studies using other embryonic brain regions in rodents to characterize the developmental patterns. In addition, our model enables the use of other host species for investigation and direct analyses of the mechanisms that lead to neuropathological conditions and alterations in the development of brain circuits, with no further need for transgenic manipulations for immunosuppressive conditions at early stages of development. It also offers the possibility to investigate the possible sequelae of stem cell transplantation and provides the paths for future therapeutic approaches such as gene therapy through this technique.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12071067/s1>, Figure S1: Illustration of the pipeline to study neuronal projections, related to Figures 3 and 4; Figure S2: Absence of Caspase-3 expression at 1 MPT and 3 MPT, related to Figure 5; Figure S3: Maturation of grafted GFP cells in LV and PFC transplants, related to Figure 5; Tables S1–S3, related to Materials and Methods Section; Video S1: Illustration of the in utero surgery with a visible embryo's brain and injection process; related to Figure 2; Video S2: 3D representation of a GFP+ neuron in the PFC; related to Figure 3. Video S3: 3D representation of GFAP labeling, related to Figure 5; other videos available upon request; Video S4: 3D reconstruction of a dendrite segment (grey) and spines (blue) of a LV-transplanted cell for VGLUT1 labeling detection, related to Figure 5; Video S5: 3D reconstruction of a dendrite segment (grey) and spines (blue) of a PFC-transplanted cell for VGLUT1 labeling detection, related to Figure 5; Video S6: 3D reconstruction of a dendrite and the spines of a GFP+ pyramidal neuron in the PFC.

Author Contributions: Conceptualization, U.M. and I.C.-T.; collection and assembly of data, data analysis and interpretation: M.L.P., C.T., M.V.d.Z., I.C.-T., S.P. and A.D.G.; writing—original draft preparation, I.C.-T.; writing—review and editing, I.C.-T., U.M., M.L.P., C.T., S.P. and M.V.d.Z.; visualization, M.L.P., C.T. and M.V.d.Z.; supervision, I.C.-T. and U.M.; funding acquisition, U.M. and I.C.-T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by grants from the French National Research Agency ANR (ANR-17-NEU3-0004, IPS BRAIN), from ERA-NET NEURON (iPSC and Brain), from the “France Fondation Alzheimer”, “Fondation Vaincre Alzheimer”, from “Equipe 2019, Projet Explore 2021”, and from ADPS-Allianz (to U.M., Head of Unit). This research was also funded by the Fondation pour la Recherche sur Alzheimer (to I.C.-T.; C.T.'s PhD funding). The Pasteur-Paris University (PPU) international doctoral program provided the funding for M.L.P.'s PhD, and “Université de Paris” provided the funding for M.V.d.Z.'s PhD (I.C.-T.'s grant applications).

Institutional Review Board Statement: Only commercial human cell lines were used. These have been recorded in the CEBOH inventory of the Institut Pasteur. Material transfer agreement for the reception of iPSC cell lines has been established between the European Bank EbiSC and Institut Pasteur (reference MTA in 2021-109_Dr Maskos). This protocol was approved by the Institut Pasteur Ethics Committee and the French “Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de l'Innovation” under reference APAFiS #20686.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are thankful to Alexandra Benchoua who performed the initial iPSC reprogramming at I-Stem Institute (Evry, France), to Aline Vitrac who performed the initial NPCs amplification and labeling, and to Astrid Castellanos for her participation in the experiments. The authors are also thankful to Myriam Mattei for advice in the surgery set up and to Florent Haiss for scientific support. We acknowledge the help of Image Analysis Hub of the Institut Pasteur for this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zakrzewski, J.L.; van den Brink, M.R.M.; Hubbell, J.A. Overcoming Immunological Barriers in Regenerative Medicine. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 786–794. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Karantalis, V.; Schulman, I.H.; Balkan, W.; Hare, J.M. Allogeneic Cell Therapy: A New Paradigm in Therapeutics. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 12–15. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Ago, K.; Nagoshi, N.; Imaizumi, K.; Kitagawa, T.; Kawai, M.; Kajikawa, K.; Shibata, R.; Kamata, Y.; Kojima, K.; Shinozaki, M.; et al. A Non-Invasive System to Monitor in Vivo Neural Graft Activity after Spinal Cord Injury. *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 803. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Piao, J.; Zabierowski, S.; Dubose, B.N.; Hill, E.J.; Navare, M.; Claros, N.; Rosen, S.; Ramnarine, K.; Horn, C.; Fredrickson, C.; et al. Preclinical Efficacy and Safety of a Human Embryonic Stem Cell-Derived Midbrain Dopamine Progenitor Product, MSK-DA01. *Cell Stem Cell* **2021**, *28*, 217–229.e7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Espuny-Camacho, I.; Michelsen, K.A.; Gall, D.; Linaro, D.; Hasche, A.; Bonnefont, J.; Bali, C.; Orduz, D.; Bilheu, A.; Herpoel, A.; et al. Pyramidal Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cells Integrate Efficiently into Mouse Brain Circuits In Vivo. *Neuron* **2013**, *77*, 440–456. [\[CrossRef\]](#)
6. Martínez-Cerdeño, V.; Barrilleaux, B.L.; McDonough, A.; Ariza, J.; Yuen, B.T.K.; Somanath, P.; Le, C.T.; Steward, C.; Horton-Sparks, K.; Knoepfler, P.S. Behavior of Xeno-Transplanted Undifferentiated Human Induced Pluripotent Stem Cells Is Impacted by Microenvironment Without Evidence of Tumors. *Stem Cells Dev.* **2017**, *26*, 1409–1423. [\[CrossRef\]](#)
7. Nori, S.; Okada, Y.; Yasuda, A.; Tsuji, O.; Takahashi, Y.; Kobayashi, Y.; Fujiyoshi, K.; Koike, M.; Uchiyama, Y.; Ikeda, E.; et al. Grafted Human-Induced Pluripotent Stem-Cell-Derived Neurospheres Promote Motor Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 16825–16830. [\[CrossRef\]](#)
8. D'Alessio, R.; Koukoulis, F.; Blanchard, S.; Catteau, J.; Raïs, C.; Lemonnier, T.; Féraud, O.; Bennaceur-Griscelli, A.; Groszer, M.; Maskos, U. Long-Term Development of Human iPSC-Derived Pyramidal Neurons Quantified after Transplantation into the Neonatal Mouse Cortex. *Dev. Biol.* **2020**, *461*, 86–95. [\[CrossRef\]](#)
9. Vitrac, A.; Pons, S.; Balkota, M.; Lemièrre, N.; Raïs, C.; Bourgeois, J.-P.; Maskos, U.; Bourgeron, T.; Cloëz-Tayarani, I. A Chimeric Mouse Model to Study Human iPSC-Derived Neurons: The Case of a Truncating SHANK3 Mutation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 13315. [\[CrossRef\]](#)
10. Fortin, J.M.; Azari, H.; Zheng, T.; Darioosh, R.P.; Schmoll, M.E.; Vedam-Mai, V.; Deleyrolle, L.P.; Reynolds, B.A. Transplantation of Defined Populations of Differentiated Human Neural Stem Cell Progeny. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23579. [\[CrossRef\]](#)
11. Daviaud, N.; Friedel, R.H.; Zou, H. Vascularization and Engraftment of Transplanted Human Cerebral Organoids in Mouse Cortex. *Eneuro* **2018**, *5*, ENEURO.0219-18.2018. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Chen, C.; Kim, W.-Y.; Jiang, P. Humanized Neuronal Chimeric Mouse Brain Generated by Neonatally Engrafted Human iPSC-Derived Primitive Neural Progenitor Cells. *JCI Insight* **2016**, *1*, e88632. [\[CrossRef\]](#)
13. Revah, O.; Gore, F.; Kelley, K.W.; Andersen, J.; Sakai, N.; Chen, X.; Li, M.-Y.; Birey, F.; Yang, X.; Saw, N.L.; et al. Maturation and Circuit Integration of Transplanted Human Cortical Organoids. *Nature* **2022**, *610*, 319–326. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Linaro, D.; Vermaercke, B.; Iwata, R.; Ramaswamy, A.; Libé-Philippot, B.; Boubakar, L.; Davis, B.A.; Wierda, K.; Davie, K.; Poovathingal, S.; et al. Xenotransplanted Human Cortical Neurons Reveal Species-Specific Development and Functional Integration into Mouse Visual Circuits. *Neuron* **2019**, *104*, 972–986.e6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Real, R.; Peter, M.; Trabalza, A.; Khan, S.; Smith, M.A.; Dopp, J.; Barnes, S.J.; Momoh, A.; Strano, A.; Volpi, E.; et al. In Vivo Modeling of Human Neuron Dynamics and Down Syndrome. *Science* **2018**, *362*, eaau1810. [\[CrossRef\]](#)
16. Raïs, C.; Gaspar Santos, D.; Sansone, G.; Blanchard, S.; Bourgeois, J.-P.; Jagla, B.; Saudemont, B.; Schlick, L.; Pons, S.; Maskos, U. A Systematic Approach for the Study of Functional Maturation of Human iPSC-Derived Neurons in Vivo (in preparation).
17. Pearl, J.I.; Lee, A.S.; Leveson-Gower, D.B.; Sun, N.; Ghosh, Z.; Lan, F.; Ransohoff, J.; Negrin, R.S.; Davis, M.M.; Wu, J.C. Short-Term Immunosuppression Promotes Engraftment of Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 309–317. [\[CrossRef\]](#)
18. Freed, W.J.; Dymecki, J.; Poltorak, M.; Rodgers, C.R. Chapter 30 Intraventricular Brain Allografts and Xenografts: Studies of Survival and Rejection with and without Systemic Sensitization. In *Progress in Brain Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1988; Volume 78, pp. 233–241. ISBN 978-0-444-81012-0.
19. Engelhardt, B.; Coisne, C. Fluids and Barriers of the CNS Establish Immune Privilege by Confining Immune Surveillance to a Two-Walled Castle Moat Surrounding the CNS Castle. *Fluids Barriers CNS* **2011**, *8*, 4. [\[CrossRef\]](#)

20. Cascalho, M.; Platt, J.L. Challenges and Potentials of Xenotransplantation. In *Clinical Immunology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; pp. 1215–1222. ISBN 978-0-323-04404-2.
21. Muldoon, L.L.; Alvarez, J.I.; Begley, D.J.; Boado, R.J.; del Zoppo, G.J.; Doolittle, N.D.; Engelhardt, B.; Hallenbeck, J.M.; Lonser, R.R.; Ohlfest, J.R.; et al. Immunologic Privilege in the Central Nervous System and the Blood–Brain Barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2013**, *33*, 13–21. [\[CrossRef\]](#)
22. Baumgarth, N. B-1 Cell Heterogeneity and the Regulation of Natural and Antigen-Induced IgM Production. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 324. [\[CrossRef\]](#)
23. Palma, J.; Tokarz-Deptuła, B.; Deptuła, J.; Deptuła, W. Natural Antibodies—Facts Known and Unknown. *Cent. Eur. J. Immunol.* **2018**, *43*, 466–475. [\[CrossRef\]](#)
24. Panda, S.; Ding, J.L. Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 13–20. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Morimoto, K.; Nakajima, K. Role of the Immune System in the Development of the Central Nervous System. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 916. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Gouder, L.; Vitrac, A.; Goubran-Botros, H.; Danckaert, A.; Tinevez, J.-Y.; André-Leroux, G.; Atanasova, E.; Lemièrre, N.; Biton, A.; Leblond, C.S.; et al. Altered Spinogenesis in iPSC-Derived Cortical Neurons from Patients with Autism Carrying de Novo SHANK3 Mutations. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 94. [\[CrossRef\]](#)
27. Boissart, C.; Poulet, A.; Georges, P.; Darville, H.; Julita, E.; Delorme, R.; Bourgeron, T.; Peschanski, M.; Benchoua, A. Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells of Cortical Neurons of the Superficial Layers Amenable to Psychiatric Disease Modeling and High-Throughput Drug Screening. *Transl. Psychiatry* **2013**, *3*, e294. [\[CrossRef\]](#)
28. Mouilleau, V.; Vaslin, C.; Robert, R.; Gribaudo, S.; Nicolas, N.; Jarrige, M.; Terray, A.; Lesueur, L.; Mathis, M.W.; Croft, G.; et al. Dynamic Extrinsic Pacing of the HOX Clock in Human Axial Progenitors Controls Motor Neuron Subtype Specification. *Development* **2021**, *148*, dev194514. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Gouder, L.; Tinevez, J.-Y.; Goubran-Botros, H.; Benchoua, A.; Bourgeron, T.; Cloëz-Tayarani, I. Three-Dimensional Quantification of Dendritic Spines from Pyramidal Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Vis. Exp.* **2015**, *10*, 53197. [\[CrossRef\]](#)
30. Avale, M.E.; Faure, P.; Pons, S.; Robledo, P.; Deltheil, T.; David, D.J.; Gardier, A.M.; Maldonado, R.; Granon, S.; Changeux, J.-P.; et al. Interplay of B2* Nicotinic Receptors and Dopamine Pathways in the Control of Spontaneous Locomotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 15991–15996. [\[CrossRef\]](#)
31. Thiberge, C.; Pou, M.L.; Vitrac, A.; Maskos, U.; Cloëz-Tayarani, I. Humanized Chimeric Mouse Models to Study Human Neural Development and Pathogenesis of Brain Diseases. In *Translational Research Methods in Neurodevelopmental Disorders*; Martin, S., Laumonnier, F., Eds.; Neuromethods; Springer US: New York, NY, USA, 2022; Volume 185, pp. 135–158. ISBN 978-1-07-162568-2.
32. Nagashima, F.; Suzuki, I.K.; Shitamukai, A.; Sakaguchi, H.; Iwashita, M.; Kobayashi, T.; Tone, S.; Toida, K.; Vanderhaeghen, P.; Kosodo, Y. Novel and Robust Transplantation Reveals the Acquisition of Polarized Processes by Cortical Cells Derived from Mouse and Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **2014**, *23*, 2129–2142. [\[CrossRef\]](#)
33. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2[−]ΔΔCT Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [\[CrossRef\]](#)
34. Elson, G.N.; DeFelipe, J. Chapter 10 Spine Distribution in Cortical Pyramidal Cells: A Common Organizational Principle across Species. In *Progress in Brain Research*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2002; Volume 136, pp. 109–133. ISBN 978-0-444-50815-7.
35. Arlotta, P.; Molyneaux, B.J.; Chen, J.; Inoue, J.; Kominami, R.; Macklis, J.D. Neuronal Subtype-Specific Genes That Control Corticospinal Motor Neuron Development In Vivo. *Neuron* **2005**, *45*, 207–221. [\[CrossRef\]](#)
36. Arlotta, P.; Molyneaux, B.J.; Jabaudon, D.; Yoshida, Y.; Macklis, J.D. Ctip2 Controls the Differentiation of Medium Spiny Neurons and the Establishment of the Cellular Architecture of the Striatum. *J. Neurosci.* **2008**, *28*, 622–632. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Saito, K.; Kakizaki, T.; Hayashi, R.; Nishimaru, H.; Furukawa, T.; Nakazato, Y.; Takamori, S.; Ebihara, S.; Uematsu, M.; Mishina, M.; et al. The Physiological Roles of Vesicular GABA Transporter during Embryonic Development: A Study Using Knockout Mice. *Mol. Brain* **2010**, *3*, 40. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Silva, C.G.; Peyre, E.; Nguyen, L. Cell Migration Promotes Dynamic Cellular Interactions to Control Cerebral Cortex Morphogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* **2019**, *20*, 318–329. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Wahle, P.; Sobierajski, E.; Gasterstädt, I.; Lehmann, N.; Weber, S.; Lübke, J.H.; Engelhardt, M.; Distler, C.; Meyer, G. Neocortical Pyramidal Neurons with Axons Emerging from Dendrites Are Frequent in Non-Primates, but Rare in Monkey and Human. *eLife* **2022**, *11*, e76101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Brüstle, O.; Maskos, U.; McKay, R.D.G. Host-Guided Migration Allows Targeted Introduction of Neurons into the Embryonic Brain. *Neuron* **1995**, *15*, 1275–1285. [\[CrossRef\]](#)
41. Fame, R.M.; Cortés-Campos, C.; Sive, H.L. Brain Ventricular System and Cerebrospinal Fluid Development and Function: Light at the End of the Tube: A Primer with Latest Insights. *BioEssays* **2020**, *42*, 1900186. [\[CrossRef\]](#)
42. Hatanaka, Y.; Zhu, Y.; Torigoe, M.; Kita, Y.; Murakami, F. From Migration to Settlement: The Pathways, Migration Modes and Dynamics of Neurons in the Developing Brain. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **2016**, *92*, 1–19. [\[CrossRef\]](#)
43. Nato, G.; Corti, A.; Parmigiani, E.; Jachetti, E.; Lecis, D.; Colombo, M.P.; Delia, D.; Buffo, A.; Magrassi, L. Immune-Tolerance to Human IPS-Derived Neural Progenitors Xenografted into the Immature Cerebellum Is Overridden by Species-Specific Differences in Differentiation Timing. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 651. [\[CrossRef\]](#)

44. Itakura, G.; Ozaki, M.; Nagoshi, N.; Kawabata, S.; Nishiyama, Y.; Sugai, K.; Iida, T.; Kashiwagi, R.; Ookubo, T.; Yastake, K.; et al. Low Immunogenicity of Mouse Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem/Progenitor Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12996. [[CrossRef](#)]
45. Cascalho, M.; Platt, J.L. The Immunological Barrier to Xenotransplantation. *Immunity* **2001**, *14*, 437–446. [[CrossRef](#)]
46. Namihira, M.; Kohyama, J.; Semi, K.; Sanosaka, T.; Deneen, B.; Taga, T.; Nakashima, K. Committed Neuronal Precursors Confer Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells. *Dev. Cell* **2009**, *16*, 245–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Vigneault, É.; Poirer, O.; Riad, M.; Prud'homme, J.; Dumas, S.; Turecki, G.; Fasano, C.; Mechawar, N.; El Mestikawy, S. Distribution of Vesicular Glutamate Transporters in the Human Brain. *Front. Neuroanat.* **2015**, *9*, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Cunningham, C.L.; Martinez-Cerdeno, V.; Noctor, S.C. Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 4216–4233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Matejuk, A.; Ransohoff, R.M. Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Popova, G.; Soliman, S.S.; Kim, C.N.; Keefe, M.G.; Hennick, K.M.; Jain, S.; Li, T.; Tejera, D.; Shin, D.; Chhun, B.B.; et al. Human Microglia States Are Conserved across Experimental Models and Regulate Neural Stem Cell Responses in Chimeric Organoids. *Cell Stem Cell* **2021**, *28*, 2153–2166.e6. [[CrossRef](#)]
51. Stogsdill, J.A.; Kim, K.; Binan, L.; Farhi, S.L.; Levin, J.Z.; Arlotta, P. Pyramidal Neuron Subtype Diversity Governs Microglia States in the Neocortex. *Nature* **2022**, *608*, 750–756. [[CrossRef](#)]
52. Tan, Y.-L.; Yuan, Y.; Tian, L. Microglial Regional Heterogeneity and Its Role in the Brain. *Mol. Psychiatry* **2020**, *25*, 351–367. [[CrossRef](#)]
53. Davis, B.M.; Salinas-Navarro, M.; Cordeiro, M.F.; Moons, L.; De Groef, L. Characterizing Microglia Activation: A Spatial Statistics Approach to Maximize Information Extraction. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1576. [[CrossRef](#)]
54. Arellano, J.I. Ultrastructure of Dendritic Spines: Correlation between Synaptic and Spine Morphologies. *Front. Neurosci.* **2007**, *1*, 131–143. [[CrossRef](#)]
55. Helm, M.S.; Dankovich, T.M.; Mandad, S.; Rammner, B.; Jähne, S.; Salimi, V.; Koerbs, C.; Leibbrandt, R.; Urlaub, H.; Schikorski, T.; et al. A Large-Scale Nanoscopy and Biochemistry Analysis of Postsynaptic Dendritic Spines. *Nat. Neurosci.* **2021**, *24*, 1151–1162. [[CrossRef](#)]
56. Linker, S.B.; Narvaiza, I.; Hsu, J.Y.; Wang, M.; Qiu, F.; Mendes, A.P.D.; Oefner, R.; Kottlil, K.; Sharma, A.; Randolph-Moore, L.; et al. Human-Specific Regulation of Neural Maturation Identified by Cross-Primate Transcriptomics. *Curr. Biol.* **2022**, *32*, 4797–4807.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

[illegible]

Figure S1 *Cont.*

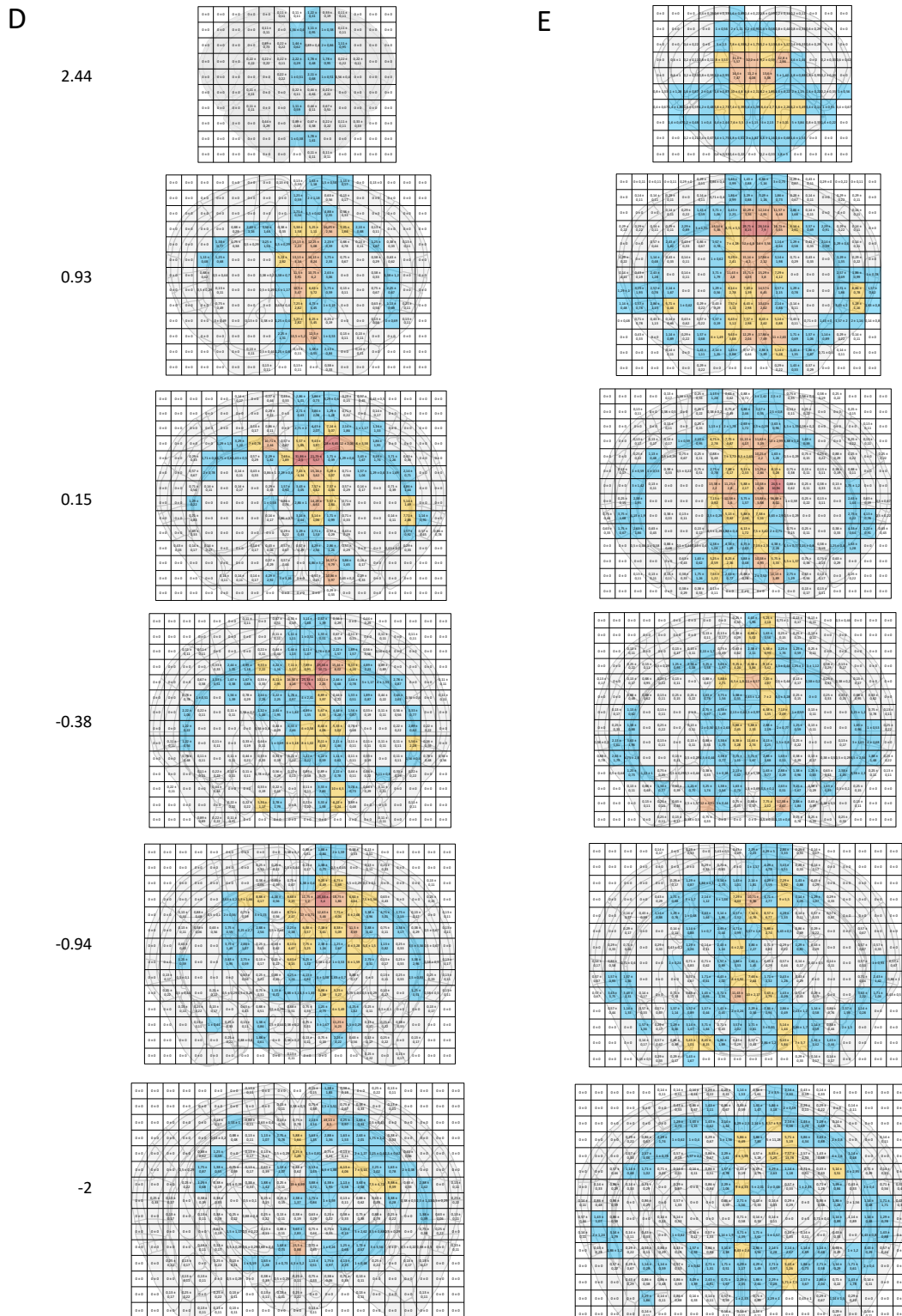


Figure S1. Illustration of the pipeline to study neuronal projections, related to Figure 3 and to Figure 4. (A) Pictures of the whole brain slice before (i, ii) and after (iii, iv) running a homemade macro (available upon request) to re-size the brain images to match the brain atlas drawings and create a grid. (B) The average and SEM of the counting of three brains are transferred into a numerical grid and merged to the coordinate illustration from the Allen Brain Atlas (Bregma, indicated in mm). A color code is used to better visualize the density and distribution of the projections. (C) Final visualization of the projection's distribution. (D-E) Extended data for the mapping of neuronal projections at 1 MPT (D) and 3 MPT (E).

Figure S2

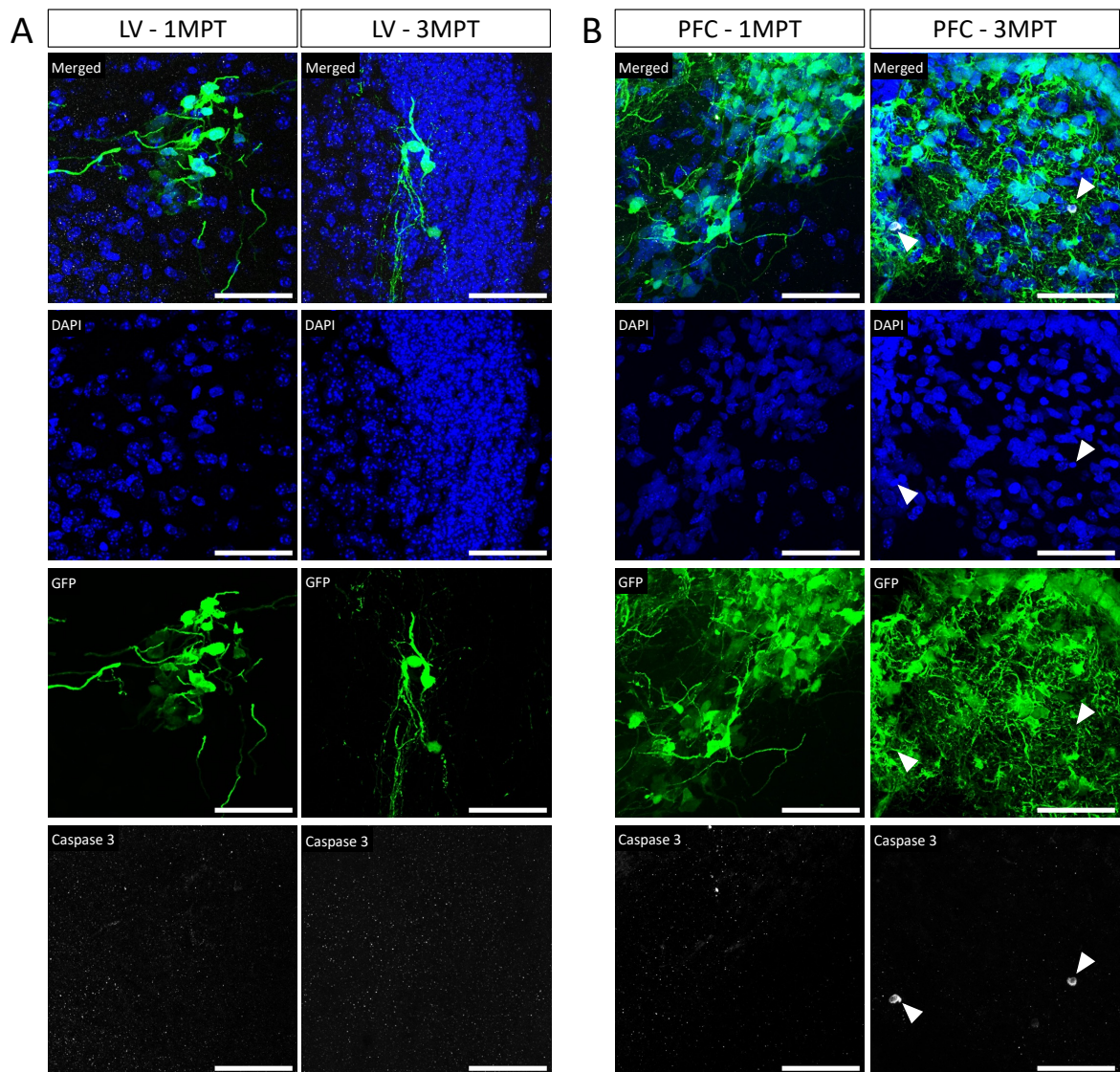


Figure S2. Absence of apoptotic GFP-cells at 1MPT and 3MPT in LV and PFC transplants, related to Figure 5. Confocal images at 1 MPT and 3 MPT for LV and PFC transplanted mice. The transplanted human cells are labeled with GFP. No GFP+ cells were labeled with the apoptotic marker Caspase3 in all conditions. Rare Caspase3+ cells (white arrows) were observed but no colocalization with the human cells is detected. Scale bar = 50µm. Results are from two independent experiments.

Figure S3

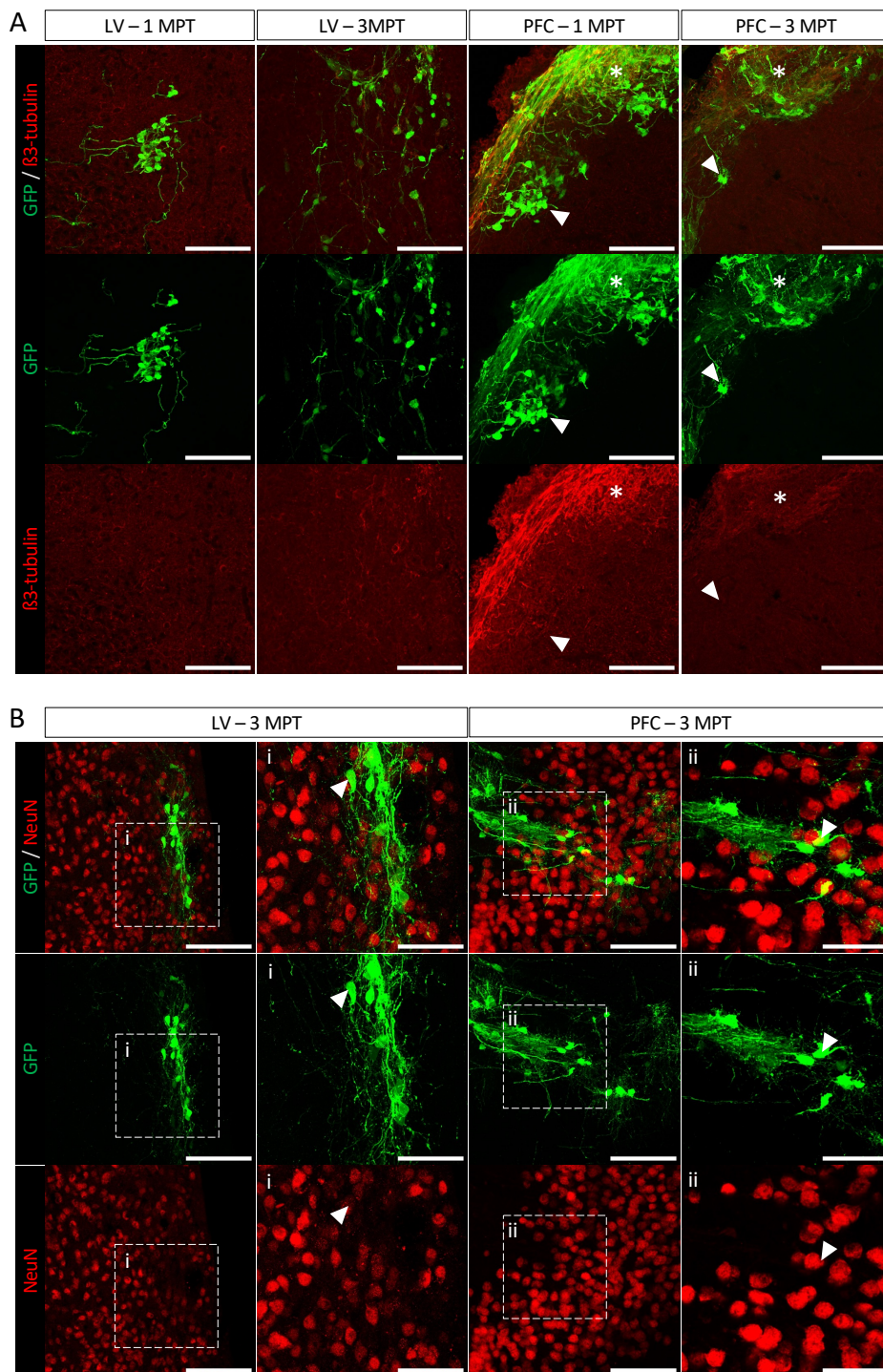


Figure S3. Maturation of grafted GFP-cells in LV (1 MPT and 3 MPT) and PFC (3 MPT) transplants, related to Figure 5. Confocal images at 3 MPT for LV and PFC transplanted mice. The transplanted human cells are labeled with GFP. (A) Immunofluorescence staining of $\beta 3$ -tubulin, a marker of the early phases of neuronal differentiation. (B) Immunofluorescence staining of NeuN, a post-mitotic neuronal marker. $\beta 3$ -tubulin-positive human cells is observed in the superficial parts of PFC transplants, where the host cells are scarce (indicated by asterisk). Only a few NeuN-positive human cells are detected within the same region. In LV transplants, only a few cells were positive for NeuN. Labeled cells are indicated by arrowheads. (A) Scale bar = 100 μ m. (B) Scale bar = 50 μ m.

Table S1. List of products with their reference and the used dilution of final concentration for NPCs medium, related to Materials and Methods Section.

NPC Medium	Ref	Company	Dilution factors
DMEM/F-12, GlutaMAX TM Supplement	31331028	ThermoFisher	1/2
Neurobasal medium	21103049	ThermoFisher	1/2
B27 supplement (50X)	11500446	ThermoFisher	1/50
N2 supplement (100X)	07152	StemCell	1/100
Penicillin Streptomycin (10 000 U/ml)	11548876	ThermoFisher	1/100
2-mercaptoethanol Stock solution (50mM)	11528926	ThermoFisher	1/1000
Factors	Ref	Company	Final concentration
Human EGF, premium grade	78006.1	StemCell	10ng/ml
Human FGF-2 IS, premium grade/BFGF	78003.1	StemCell	10ng/ml
Human Recombinant BDNF	78005	StemCell	20ng/ml
Coating	Ref	Company	Final concentration
Geltrex	A1413302	ThermoFisher	120-180µg/ml
Laminine (1mg/ml)	L2020	Sigma	10µg/ml
Poly-L-Ornithine (1mg/ml)	P3655	Sigma	15µg/ml

Table S2. List of primers used for Real-Time PCR, related to Materials and Methods Section.

Gene	Primers	Product size (bp)
Oct4	5'- CAGCAGATCAGCCACATCGC-3' 3'- CCACACTCGGACCACATCCT-5'	60
Nestin	5'-TTCCCTCAGCTTTCAGGACCC-3' 3'-CTCAAGGGTAGCAGGCAAGG-5'	130
Pax6	5'-GCAAGAATACAGGTATGGTTTTC-3' 3'-GTGGGTTGTGGAATTGGTTG-5'	155
Tuj1	5'-CTACAACGAGGCCTCTTCTCACAA-3' 5'-GGTTCAGGTCCACCAGAATG-3'	60
VGLUT1	5'- CGACAGCCTTTTGTGGTTCC-3' 3'-GGTTCATGAGTTTCGCGCTC-5'	237
Cux1	5'- GCTCTCATCGGCCAATCACT-3' 3'-TCTATGGCCTGCTCCACGT-5'	75
CTIP2	5'-GAGTACTGCGGCAAGGTGTT-3' 3'-TAGTTGCACAGCTCGCACTT-5'	98
VGAT	5'-CCATCCAGGGCATGTTC-3' 3'-GTGTAGCAGCACACAACG-5'	103
GFAP	5'-TCCACGAGGAGGAGGTTTCG-3' 3'-GGCAGCAGCGTCTGTCTAG-5'	200
GAPDH	5'-TCTGCTCCTCCTGTTTCGACA-3' 3'-AAAAGCAGCCCTGGTGACC-5'	141

Table S3. List of antibodies used for immunohistochemistry and immunocytochemistry, related to Materials and Methods Section.

PRIMARY ANTIBODIES				
Name	Ref	Company	Host	Dilution
GFAP	G-3893	Sigma	Mouse	1/200
GFP	A6455	Invitrogen	Rabbit	1/750
GFP	MAB3580	Millipore	Mouse	1/750
Iba1	019-19741	Wako Chemicals	Rabbit	1/500
Ki67	14-5698-80	Invitrogen	Rat	1/100
Nestin	MAB5326	Millipore	Mouse	1/200
NeuN	MAB377	Millipore	Mouse	1/200
SOX2	14-9811-80	Invitrogen	Rat	1/100
VGLUT1	135303	Synaptic System	Rabbit	1/1000
Olig2	Ab220796	Abcam	Rabbit	1/1000
β 3-Tubulin	Ab9354	Abcam	Chicken	1/200
Caspase-3	9661	Cell Signaling	Rabbit	1/300
SECONDARY ANTIBODIES				
Name	Ref	Company	Host	Dilution
Anti-mouse Alexa 488	715-545-150	Jackson Laboratory	Donkey	1/500
Anti-rabbit Alexa 488	711-545-152	Jackson Laboratory	Donkey	1/500
Anti-mouse Alexa 594	715-585-150	Jackson Laboratory	Donkey	1/500
Anti-rabbit Alexa 594	711-585-152	Jackson Laboratory	Donkey	1/500
Anti-rat Alexa 594	712-585-153	Jackson Laboratory	Donkey	1/500
Anti-chicken Alexa 594	703-585-155	Jackson Laboratory	Donkey	1/500
Anti-mouse Alexa 647	715-605-151	Jackson Laboratory	Donkey	1/500
Anti-rabbit Alexa 647	711-605-152	Jackson Laboratory	Donkey	1/500
Anti-rat Alexa 647	712-605-153	Jackson Laboratory	Donkey	1/500

Video S1. Illustration of the in -utero surgery with a visible embryo 's brain and injection process, related to Figure 2.

Video S2. 3D representation of a GFP+ neuron in the PFC, using Imaris 9.5 software, related to Figure 3.

Video S3: 3D representation of GFAP labeling using Imaris 9.5 software, related to Figure 5. GFAP labeling is in red fluorescence. The results show the absence of GFAP colabeling with human GFP+ cells. Other videos are available upon request.

Video S4. 3D reconstruction of a dendrite segment (grey) and spines (blue) of a LV transplanted cell, related to Figure 5. Yellow dots represent colocalization of VGLUT1 with the dendrite and the red dots represent a negative colocalization between VGLUT1 and the neuron.

Video S5. 3D reconstruction of a dendrite segment (grey) and spines (blue) of a PFC transplanted cell using the Imaris 9.5 software, related to Figure 5. Green dots represent colocalization between VGLUT1 and the spine and yellow dots represent colocalization of VGLUT1 with the dendrite. The red dots represent a negative colocalization between VGLUT1 and the neuron.

Video S6. 3D reconstruction of a dendrite and the spines of a GFP+ neuron in the PFC using the Imaris 9.5 software, related to Figure 6. Color classification of the spines is as follows: purple = filopodia, red = stubby, green = mushroom, blue = thin.

RESULTAT – PARTIE BMI1

ARTICLE 2 : Conséquences de l'inhibition de BMI1 dans des neurones humains dérivés d'iPSC greffées dans le cortex préfrontal du cerveau de souris adulte.

Impact of BMI1 silencing in human iPSC-derived neurons xenografted in prefrontal cortex of adult mouse brain

Camille Thiberge ^{1,2}, Maria Llach Pou^{1,2} ; Michiel Van der Zwan ^{1,2}, Stéphanie Pons¹,
Alexandre Mathieu³, Uwe Maskos^{1,2}, Isabelle Cloëz-Tayarani ^{1,2*}

¹ Institut Pasteur, Université Paris Cité, Unité de Neurobiologie Intégrative des Systèmes Cholinergiques, and CNRS UMR 3571 “Gènes, Synapses et Cognition”, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

² Sorbonne Université, Collège doctoral, 75005 Paris, France.

³ Génétique Humaine et Fonctions Cognitives, Institut Pasteur, CNRS UMR 3571, IUF, Université Paris Cité, Paris, France

*Correspondence : Isabelle Cloëz-Tayarani. Tel +33 (0)1 45 68 88 04

Discussion

La MA est une forme majoritaire de démence. Bien que son incidence diminue dans les pays les plus développés sa prévalence est prévue à la hausse. La MA est une maladie toujours incurable et les traitements actuels visent uniquement à réduire les symptômes et ralentir sa progression. L'étiologie de la forme principale de la MA reste inconnue.

Le développement de modèles *in vivo* pour les maladies neurodégénératives telles que la MA connaît actuellement un grand essor. En effet, la xénotransplantation de cellules humaines reprogrammées dans le cerveau d'animaux de laboratoire représente un modèle de choix pour l'étude des maladies sur de plus longues périodes, par rapport aux modèles *in vitro*. Cette approche permet aux cellules greffées de bénéficier d'un environnement davantage physiologique. Divers paramètres peuvent être étudiés comme l'intégration des cellules humaines dans diverses structures du cerveau de l'hôte, l'activité neuronale, la connectivité des neurones au sein d'un réseau local établi. Modéliser la MA par cette approche de xénotransplantation est un double challenge car d'une part cette maladie est une pathologie complexe et multifactorielle comme le montrent les études GWAS, et d'autre part, l'âge étant un facteur important de la maladie, les cellules doivent atteindre un stade de maturation représentatif de celui des neurones des patients, avant l'apparition de leurs premiers symptômes détectables cliniquement. Des expériences ont pu toutefois démontrer que les phénotypes de la maladie peuvent être reproduits à partir de neurones dérivés d'iPSC de patients atteints de la MA, à la fois pour les formes familiales et sporadiques de la maladie. Des protocoles de différenciation des hiPSC en neurones ont été développés et optimisés, permettant de cibler les études sur des populations neuronales diverses et ainsi décrypter plus précisément les mécanismes physiopathologiques impliqués. L'un des avantages d'étudier *in vivo* les phénotypes moléculaires et cellulaires de la MA à partir de modèles de neurones encore peu matures, réside dans la possibilité d'accès aux stades très précoces de la maladie, encore inconnus. Il reste toutefois important de bien prendre en compte que l'interprétation des résultats peut s'avérer compliquée en raison de la nature multifactorielle de la MA sporadique, puisque c'est à cette forme que nous nous intéressons plus particulièrement dans cette étude.

Dans ce cadre, mes travaux de thèse se sont orientés vers la modulation du gène *BMII*, afin d'étudier les dysfonctionnements précoces de la forme sporadique de la MA, en envisageant une possibilité d'accès à différents modèles de xénotransplantation.

Une première approche qui pouvait présenter des avantages significatifs est la xénogreffe *in-utero* de précurseurs de neurones humains dans l'embryon de souris (E17.5). En effet, cette approche permet de s'affranchir de l'utilisation de souris immunodéficientes, pouvant induire des biais dans l'interprétation des données. Aussi, un contexte se rapprochant des conditions physiologiques et préféablement immunocompétent nous paraissait davantage pertinent et innovant.

Développement du modèle de greffe in utero

L'utilisation de souris humanisées a été particulièrement appliquée dans le domaine de pathologies neurodéveloppementales, et aussi pour comprendre comment des neurones humains peuvent s'intégrer, migrer dans leurs structures cibles, et devenir fonctionnels dans le cerveau hôte (Espuny-Camacho et al., 2013; Vitrac et al., 2020). Un aspect particulièrement important en faveur de l'utilisation de tels modèles, réside dans le fait que les neurones humains greffés ont la capacité de conserver leur identité d'origine et leurs caractéristiques juvéniles chez la souris hôte devenue adulte. Cette propriété est désignée par le terme « néoténie ». Un autre avantage de ces modèles de xénotransplantation est que l'étude des cellules humaines greffées peut s'effectuer jusqu'à 11 mois après greffe (Linaro et al., 2019).

La plupart des xénotransplantations de cellules ESC ou iPSC décrites à ce jour, sont réalisées chez la souris au stade néonatal ou chez la souris adulte dans un contexte immunodéficient, pour éviter le rejet de greffe. Dans le cadre de la MA, le contexte immunitaire joue un rôle essentiel puisque la neuroinflammation est considérée comme l'un des marqueurs de la pathologie. La xénotransplantation in utero peut permettre en théorie de contourner cet aspect. En effet le rejet de greffe résulte d'une réaction concertée du système immunitaire inné qui n'est pas encore mature au moment de la transplantation. Des études précédentes ont pu montrer que la transplantation in utero de progéniteurs dérivés d'ESC humaines permet aux cellules de s'intégrer et de migrer dans les structures cibles, sans rejet apparent dans les deux mois suivant la greffe (Brüstle et al., 1998). Pour ce protocole, nous avons voulu comparer nos résultats avec ceux obtenus précédemment et permettant d'avoir comme outil cellulaire des précurseurs neuronaux déjà caractérisés et identifiés au laboratoire (Boissart et al., 2013). Le protocole de différenciation permet l'obtention de près de 80% de neurones corticaux excitateurs (Boissart et al., 2013), corrélant ainsi avec ce qui est observé in vivo (Rubenstein, 2011). Nous avons voulu cibler deux régions cérébrales différentes pour la mise en place du protocole de greffe in utero, avec l'idée initiale que les cellules greffées, bien qu'identiques, pourraient se différencier différemment, selon leur position dans le cerveau en développement, et selon leur contrôle local par des facteurs pouvant agir de façon très spécifique. (Jabaudon, 2017). Deux régions ont ainsi été ciblées : le système ventriculaire et le PFC. Au stade embryonnaire retenu (E17.5), la corticogénèse est toujours en cours et correspond à la mise en place des couches corticales supérieures II et III (Van Den Aemele et al., 2014) (Figure 21). D'un point de vue expérimental, les ventricules sont visibles à l'œil nu, par transparence, facilitant la xénotransplantation.

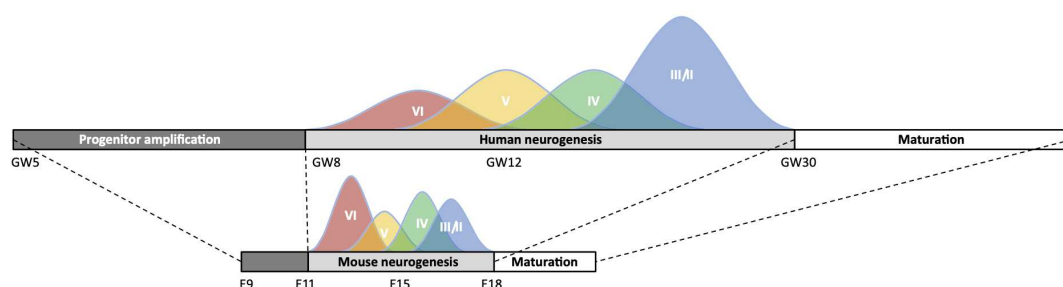


Figure 20 : Chronologie du processus de corticogénèse et de maturation neuronale chez l'homme et la souris.

VI, V, IV, III/II correspondent aux différentes couches corticales (D'après Van Den Ameele et al., 2014)

Après 2 semaines, les NPC-GFP étaient visibles et avaient, pour la plupart, initié un processus de migration dans des zones de connexion importantes comme le corps calleux connectant les deux hémisphères et indispensable à une bonne coordination de leurs fonctions ; le « cingulum » et la « fimbria », faisceaux de fibres de la substance blanche connectant différentes régions du système limbique. Ce dernier est impliqué dans de nombreux processus cognitifs comme la mémoire ou les émotions et est une région particulièrement touchée dans le cadre de la MA (Rolls, 2019). Notre étude a été réalisée à deux temps post-transplantation, 1MPT et 3MPT pour une étude suivie de l'intégration et de la maturation des NPC greffés au cours du temps et chez la souris devenue adulte. Dans le cas des greffes ventriculaires, les corps cellulaires et projections ont pu être retrouvés ipsi- et contra-latéralement, montrant la possibilité de ces cellules d'entreprendre une migration à longue distance.

Une méthode de cartographie semi-quantitative a été mise en place, de manière à pouvoir comparer leur distribution entre ces deux temps en post-greffe et ce de manière reproductible. Le script utilisé permet dans un premier temps de redimensionner les coupes immuno-marquées par rapport à un atlas de référence, limitant ainsi le biais d'une éventuelle déformation des coupes au moment du montage sur lamelles. Un des points limites à cette approche est qu'il n'existe pas à notre connaissance d'atlas de souris à 1MPT correspondant au stade de la puberté murine (Klappenbach et al., 2023), ce qui peut entraîner une légère imprécision au moment de l'analyse des différentes structures. C'est pour autant une période particulièrement intéressante puisqu'elle se traduit par d'important changements dans la structure du cerveau. Elle se caractérise entre autres par un remaniement synaptique et une myélinisation renforcée des axones (Agoglia et al., 2017). Les projections ont pu être détectées dans différentes structures proches des ventricles latéraux et du 3^{ème} ventricule avec des densités maximales au niveau du corps calleux, du septum, des ganglions de la base, de l'hippocampe et des noyaux thalamiques. Cette distribution s'avère un peu différente de celle qui a pu être observée lors de la transplantation à la

naissance (P0-P1), en utilisant les mêmes cellules et greffées à un même stade de différenciation (Vitrac et al., 2020) indiquant que les cellules pourraient migrer différemment lorsqu'elles sont transplantées à un stade plus précoce.

La quantification des corps cellulaires est particulièrement difficile lorsque les cellules sont transplantées dans les ventricules latéraux puisque, selon le temps auquel on les observe, elles peuvent avoir migré dans différentes régions du cerveau. Notre approche permet toutefois de fournir des indications fiables sur la distribution spatiale des cellules. Nos résultats ont ainsi pu montrer que la distribution des corps cellulaires à 1MPT était similaire à celle des projections, c'est-à-dire proche des structures du ventricule. A 3MPT, les corps cellulaires sont visibles dans des structures plus éloignées comme le cortex cingulaire ou l'aire pré-optique. La méthode que nous utilisons pour étudier la dispersion des corps cellulaires n'est pas optimisée pour une caractérisation quantitative. Une technique que nous pourrions utiliser dans ce contexte serait la caractérisation à l'aide de la méthode de clarification du cerveau. Cette technique repose sur la diminution de l'indice de réfraction des tissus par le remplacement des lipides et fluides à l'aide d'une solution artificielle facilitant le passage de la lumière. La technique iDISCO est un exemple qui permet la visualisation de cellules ciblées par immunomarquage en 3D grâce à la reconstruction de structures clarifiées et imagées par microscopie à haute résolution. (Renier et al., 2014)

L'une des perspectives de cette approche est l'étude fonctionnelle des neurones greffées dans le contexte de la MA. Le cortex, dont le préfrontal est particulièrement impacté par la pathologie et constitue l'une des régions précocement touchées par la pathologie amyloïde. La transplantation de cellules dans cette région in utero représente un avantage technique certain puisqu'il permet de faciliter la sélection des individus greffés par l'utilisation de macroscopie, ces cellules exprimant la GFP. Peu de neurones ont été observés au niveau des couches superficielles du cortex lorsque ces dernières étaient transplantées au niveau des LV. La transplantation dans le PFC est techniquement plus difficile et pourrait aussi entraîner davantage de variabilité sur la zone corticale ciblée.

Comme évoqué précédemment, les neurones greffés gardent leurs propriétés intrinsèques de développement et mûrissent plus lentement que les cellules murines. Au stade 2MPT, les NPC commencent alors à se différencier en cellules excitatrices et expriment le marqueur VGLUT1 à la fois au niveau du corps cellulaire et des projections, lorsque transplantées dans les LV. A 3MPT, les neurones ont perdu leur capacité de prolifération comme l'indique l'absence du marquage SOX2. Il a été observé que les mêmes NPC peuvent se différencier plus tardivement en astrocytes (Namihira et al., 2009). Selon nos conditions expérimentales, aucun astrocyte n'a pu être détecté in vivo à 3MPT. Les résultats ont également pu montrer une différenciation plus avancée des neurones greffés au niveau du PFC comparés

à ceux greffés dans les LV. Bien que l'expression du marqueur VGLUT1 ait pu être observé dans les deux approches, seuls les neurones isolés ayant migré en dehors du corps de la greffe située dans le PFC, expriment le marqueur de différenciation neuronal NeuN.

Nous nous sommes également intéressés à la microglie car elle contribue à la maturation de la connectivité des neurones (Matejuk and Ransohoff, 2020). Une première analyse a permis de montrer un nombre plus élevé de microglie au niveau des greffes du PFC tandis qu'aucune différence n'a pu être observée lors de la greffe ventriculaire. Des analyses plus approfondies quant au rôle de la microglie dans la maturation des neurones greffés pourraient être menées (Cserép et al., 2022). Ces dernières sont également impliquées dans la neuroinflammation et leur activation se traduit par le passage d'un corps cellulaire présentant de nombreuses ramifications à une morphologie amiboïde (Jurga et al. 2020). Il serait intéressant dans ce cas d'affiner ces observations en étudiant la morphologie de la microglie et de s'intéresser par exemple à l'index de complexité ou la forme des noyaux et du cytoplasme. Le laboratoire dispose par ailleurs de l'expertise et de l'outil Acapella, un logiciel permettant de générer de manière automatique les caractéristiques morphologiques de la microglie, (Verdonk et al., 2016) et qui pourrait être utilisé dans ce but.

La densité et la morphologie synaptique sont des indicateurs clé de la plasticité synaptique au cours du développement et chez l'adulte puisque celles-ci sont à l'origine de la transmission nerveuse. L'altération synaptique est une des caractéristiques de la MA qui se traduit par une perte synaptique et un changement dans les ratios des différents types d'épines selon les régions cérébrales (Griffiths and Grant, 2023). L'approche in utero permet également de s'intéresser à cet aspect du développement. L'étude morphologique des épines dendritiques a été étudié grâce à une méthodologie développée dans le laboratoire et qui se base sur l'utilisation du logiciel de reconstruction 3D IMARIS. (Gouder et al., 2019). La figure 22 suivante reprend les différents paramètres mesurés.

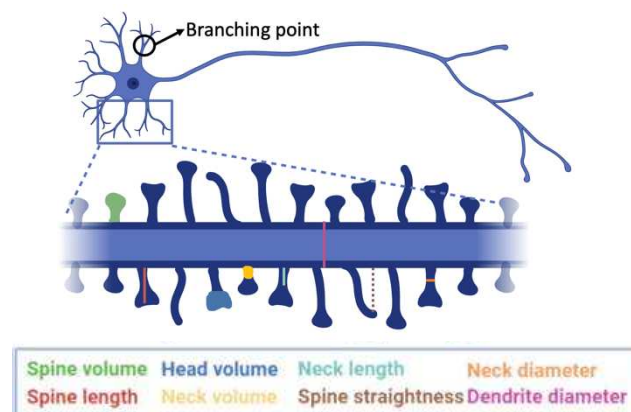


Figure 21 : Illustration des paramètres mesurés pour les épines dendritiques

(Modifiée de Llach Pou, Thiberge et al., 2023)

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une complexité plus importante de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux corticaux lorsqu'ils sont transplantés au niveau du PFC. Ces derniers présentent également à 3MPT des dendrites plus volumineuses et des densités d'épines dendritiques plus importantes que celles transplantées dans les LV à 3MPT. L'une des hypothèses permettant d'expliquer ces différences est que les neurones greffés au niveau des LV migrent avant de rejoindre leur destination et sont exposés plus tardivement aux molécules des couches corticales auxquelles ils appartiennent. Les neurones greffés directement dans le PFC sont, eux, exposés directement aux facteurs extrinsèques ce qui entrainerait une maturation neuronale plus précoce. Ceci met en évidence un effet de l'environnement local sur la maturation neuronale.

Conclusion et Perspectives in utero

Jusqu'à présent une seule étude à notre connaissance a tenté de transplanter des NPC dérivés d'iPSC in utero. Ne pouvant observer la présence de neurones greffés au-delà du stade 1MPT, les auteurs ont conclu que les NPC en se différenciant présentaient des épitopes pouvant être reconnus par le système immunitaire murin déjà suffisamment mature, entraînant le rejet de la greffe. Pour confirmer leur hypothèse, ces auteurs ont également transplanté simultanément des NPC et des neurones post mitotiques immatures ce qui leur a permis d'obtenir de greffes pouvant survivre au-delà du stade 1MPT (Nato et al., 2021).

Sur la base des résultats de cette équipe, nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle les cellules humaines greffées dans le cas de notre étude, soient à un stade d'immaturité différent et présentent des épitopes reconnus par le système immunitaire de l'hôte, que plus tardivement.

Nous avons également recherché à un stade plus avancé de la greffe (6MPT), la présence de neurones plus matures et toujours visualisables. Nous n'avons pu observer un nombre significatif de cellules marquées à ce stade sur les cerveaux testés, ce qui semblerait confirmer notre hypothèse. La sélection des souris greffées pour les temps 1MPT et 3MPT s'est faite de manière aléatoire à partir de 3 portées différentes. Comme illustré dans l'article publié, les portées sont importantes (10-14 embryons). Ainsi, chaque portée a donné la possibilité de conduire l'étude sur des temps différents post-greffe. La xénotransplantation induit une variabilité et il est très probable que le taux de succès de cette technique ne soit pas de 100%. Lors de la transplantation nous avons pu observer que les NPC peuvent ne pas être toutes injectées et ressortir après l'injection selon un geste non optimisé, augmentant ainsi la probabilité d'embryon non greffés. Ainsi il est difficile de conclure à ce stade au rejet de greffe, au moins au-delà de 3 mois. De plus, nous n'avons observé aucun marquage Caspase 3, marqueur d'apoptose cellulaire. De nouvelles analyses à des stades compris entre 3 et 6 MPT seraient nécessaires pour évaluer plus

précisément le temps de survie des greffes. Nous avons réalisé la même étude sur une autre lignée, avec des résultats similaires en termes d'intégration au temps précoces uniquement.

Les analyses transcriptomiques sur cellules uniques se sont particulièrement développées ces dernières années. Afin de mieux comprendre les interactions entre les cellules humaines et les cellules murines, nous avons entrepris une analyse basée sur la technique du « 10X Génomique » en collaboration avec la plateforme CB UTechS de l'Institut Pasteur. Cette technique permet d'étudier les profils d'expression sur des milliers de cellules grâce à un système microfluidique comme indiqué sur le schéma ci-dessous.

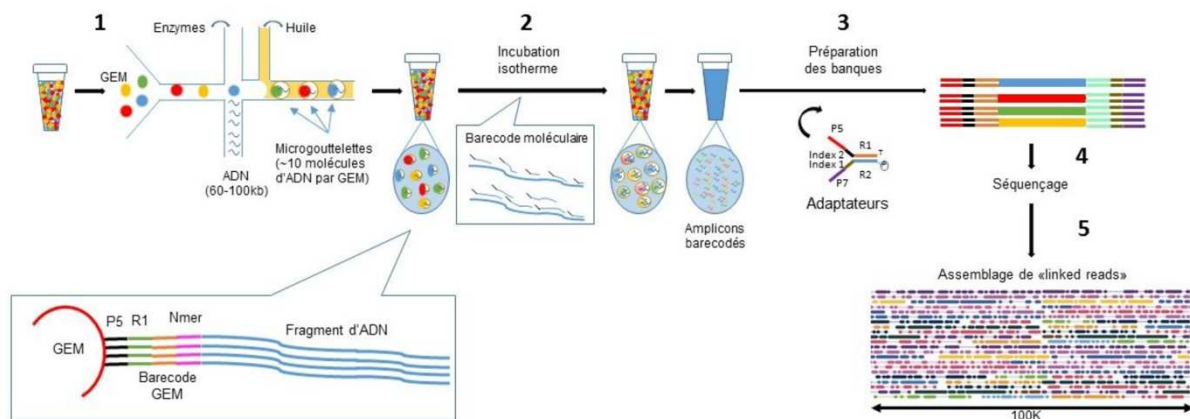


Figure 22 : Illustration de la technique de 10X Genomic (france-genomique.org)

Une première analyse a été initiée concernant les cellules transplantées dans les LV au stade 3MPT. Nous avons établi un protocole d'extraction sur coupe entière des cellules humaines marqué à la GFP et de cellules murines. L'étude du transcriptome humain et murins en simultanée pourra contribuer à une meilleure compréhension de leur interaction. Elle pourra également nous renseigner sur l'état de maturation des cellules et une possible altération de leur état. Cette approche sera ensuite répétée avec les greffes du PFC à 3MPT pour pouvoir établir une comparaison et approfondir nos résultats quant à l'influence de l'hôte murin sur la maturation des cellules humaines.

Références

Bibliographie

A. Armstrong, R. (2019). Risk factors for Alzheimer's disease. *Fn* 57, 87–105. <https://doi.org/10.5114/fn.2019.85929>.

Abdouh, M., Chatooh, W., El Hajjar, J., David, J., Ferreira, J., and Bernier, G. (2012). Bmi1 Is Down-Regulated in the Aging Brain and Displays Antioxidant and Protective Activities in Neurons. *PLoS ONE* 7, e31870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031870>.

Abdouh, M., Hanna, R., El Hajjar, J., Flamier, A., and Bernier, G. (2016). The Polycomb Repressive Complex 1 Protein BMI1 Is Required for Constitutive Heterochromatin Formation and Silencing in Mammalian Somatic Cells. *Journal of Biological Chemistry* 291, 182–197. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.662403>.

Agoglia, A.E., Holstein, S.E., Small, A.T., Spanos, M., Burrus, B.M., and Hodge, C.W. (2017). Comparison of the adolescent and adult mouse prefrontal cortex proteome. *PLoS ONE* 12, e0178391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178391>.

Ain, Q., Schmeer, C., Penndorf, D., Fischer, M., Bondeva, T., Förster, M., Haenold, R., Witte, O.W., and Kretz, A. (2018). Cell cycle-dependent and -independent telomere shortening accompanies murine brain aging. *Aging* 10, 3397–3420. <https://doi.org/10.18632/aging.101655>.

Andrew, R.J., Kellett, K.A.B., Thinakaran, G., and Hooper, N.M. (2016). A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 291, 19235–19244. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.746032>.

Arnsten, A.F.T., Datta, D., Del Tredici, K., and Braak, H. (2021). Hypothesis: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 17, 115–124. <https://doi.org/10.1002/alz.12192>.

Arranz, A.M., and De Strooper, B. (2019). The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. *The Lancet Neurology* 18, 406–414. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30490-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30490-3).

Baglietto-Vargas, D., Forner, S., Cai, L., Martini, A.C., Trujillo-Estrada, L., Swarup, V., Nguyen,

M.M.T., Do Huynh, K., Javonillo, D.I., Tran, K.M., et al. (2021). Generation of a humanized A β expressing mouse demonstrating aspects of Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Commun* 12, 2421. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22624-z>.

Barak, M., Fedorova, V., Pospisilova, V., Raska, J., Vochyanova, S., Sedmik, J., Hribkova, H., Klimova, H., Vanova, T., and Bohaciakova, D. (2022). Human iPSC-Derived Neural Models for Studying Alzheimer's Disease: from Neural Stem Cells to Cerebral Organoids. *Stem Cell Rev and Rep* 18, 792–820. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10254-3>.

Bellenguez, C. (2022). New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nature Genetics* 54, 33. .

Bhattacharya, R., Banerjee Mustafi, S., Street, M., Dey, A., and Dwivedi, S.K.D. (2015). Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology. *Genes & Diseases* 2, 225–239. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2015.04.001>.

Birey, F., Andersen, J., Makinson, C.D., Islam, S., Wei, W., Huber, N., Fan, H.C., Metzler, K.R.C., Panagiotakos, G., Thom, N., et al. (2017). Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature* 545, 54–59. <https://doi.org/10.1038/nature22330>.

Bjerke, M., and Engelborghs, S. (2018). Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Early and Differential Alzheimer's Disease Diagnosis. *JAD* 62, 1199–1209. <https://doi.org/10.3233/JAD-170680>.

Blackburn, E.H., Epel, E.S., and Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* 350, 1193–1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>.

Blackledge, N.P., and Klose, R.J. (2021). The molecular principles of gene regulation by Polycomb repressive complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 815–833. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00398-y>.

Blagosklonny, M.V. (2013). Aging is not programmed: Genetic pseudo-program is a shadow of developmental growth. *Cell Cycle* 12, 3736–3742. <https://doi.org/10.4161/cc.27188>.

Blagosklonny, M.V. (2014). Geroconversion: irreversible step to cellular senescence. *Cell Cycle* 13, 3628–3635. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.985507>.

Blinkouskaya, Y., Caçoilo, A., Gollamudi, T., Jalalian, S., and Weickenmeier, J. (2021). Brain aging

mechanisms with mechanical manifestations. *Mechanisms of Ageing and Development* 200, 111575. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111575>.

Bohlen, C.J., Friedman, B.A., Dejanovic, B., and Sheng, M. (2019). Microglia in Brain Development, Homeostasis, and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Genet.* 53, 263–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043515>.

Boissart, C., Poulet, A., Georges, P., Darville, H., Julita, E., Delorme, R., Bourgeron, T., Peschanski, M., and Benchoua, A. (2013). Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl Psychiatry* 3, e294–e294. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.71>.

Brüstle, O., Choudhary, K., Karram, K., Hüttner, A., Murray, K., Dubois-Dalcq, M., and McKay, R.D.G. (1998). Chimeric brains generated by intraventricular transplantation of fetal human brain cells into embryonic rats. *Nat Biotechnol* 16, 1040–1044. <https://doi.org/10.1038/3481>.

Busche, M.A., Eichhoff, G., Adelsberger, H., Abramowski, D., Wiederhold, K.-H., Haass, C., Staufenbiel, M., Konnerth, A., and Garaschuk, O. (2008). Clusters of Hyperactive Neurons Near Amyloid Plaques in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Science* 321, 1686–1689. <https://doi.org/10.1126/science.1162844>.

Cain, J.A., Montibus, B., and Oakey, R.J. (2022). Intragenic CpG Islands and Their Impact on Gene Regulation. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 832348. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.832348>.

Campeau, E., and Gobeil, S. (2011). RNA interference in mammals: behind the screen. *Briefings in Functional Genomics* 10, 215–226. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elr018>.

Carlén, M. (2017). What constitutes the prefrontal cortex? *Science* 358, 478–482. <https://doi.org/10.1126/science.aan8868>.

Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 27, 275–280. <https://doi.org/10.1038/nbt.1529>.

Chatoos, W., Abdouh, M., David, J., Champagne, M.-P., Ferreira, J., Rodier, F., and Bernier, G. (2009). The Polycomb Group Gene *Bmi1* Regulates Antioxidant Defenses in Neurons by Repressing *p53* Pro-Oxidant Activity. *J. Neurosci.* 29, 529–542. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5303-08.2009>.

Chen, H., Qian, K., Chen, W., Hu, B., Blackbourn, L.W., Du, Z., Ma, L., Liu, H., Knobel, K.M., Ayala, M., et al. (2015). Human-derived neural progenitors functionally replace astrocytes in adult mice. *J. Clin. Invest.* *125*, 1033–1042. <https://doi.org/10.1172/JCI69097>.

Chittock, E.C., Latwiel, S., Miller, T.C.R., and Müller, C.W. (2017). Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochemical Society Transactions* *45*, 193–205. <https://doi.org/10.1042/BST20160173>.

Cline, E.N., Bicca, M.A., Viola, K.L., and Klein, W.L. (2018). The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *JAD* *64*, S567–S610. <https://doi.org/10.3233/JAD-179941>.

Corti, S., Faravelli, I., Cardano, M., and Conti, L. (2015). Human pluripotent stem cells as tools for neurodegenerative and neurodevelopmental disease modeling and drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* *10*, 615–629. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1037737>.

Costa, N.S., Vicente, M.A., Cipriano, A.C., Miguel, T.T., and Nunes-de-Souza, R.L. (2016). Functional lateralization of the medial prefrontal cortex in the modulation of anxiety in mice: Left or right? *Neuropharmacology* *108*, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.011>.

Cserép, C., Schwarcz, A.D., Pósfai, B., László, Z.I., Kellermayer, A., Környei, Z., Kisfali, M., Nyerges, M., Lele, Z., Katona, I., et al. (2022). Microglial control of neuronal development via somatic purinergic junctions. *Cell Reports* *40*, 111369. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111369>.

Cummings, J., Lee, G., Nahed, P., Kambar, M.E.Z.N., Zhong, K., Fonseca, J., and Taghva, K. (2022). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. *A&D Transl Res & Clin Interv* *8*. <https://doi.org/10.1002/trc2.12295>.

Cutter, A.R., and Hayes, J.J. (2015). A brief review of nucleosome structure. *FEBS Letters* *589*, 2914–2922. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.016>.

Darmanis, S., Sloan, S.A., Zhang, Y., Enge, M., Caneda, C., Shuer, L.M., Hayden Gephart, M.G., Barres, B.A., and Quake, S.R. (2015). A survey of human brain transcriptome diversity at the single cell level. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, 7285–7290. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507125112>.

DeTure, M.A., and Dickson, D.W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegeneration* *14*, 32. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>.

Deutsch, J., Lamour-Isnard, C., and Lepesant, J.-A. *PRIX NOBEL DE MÉDECINE* 1995.

- Dregni, A.J., Duan, P., Xu, H., Changolkar, L., El Mammeri, N., Lee, V.M.-Y., and Hong, M. (2022). Fluent molecular mixing of Tau isoforms in Alzheimer's disease neurofibrillary tangles. *Nat Commun* 13, 2967. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30585-0>.
- Drummond, E., and Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133, 155–175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>.
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H.H., Scheltens, P., Aisen, P., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., et al. (2016). Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's & Dementia* 12, 292–323. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.002>.
- Earnshaw, W.C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 337–343. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80088-3](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80088-3).
- El Hajjar, J., Chatoo, W., Hanna, R., Nkanza, P., Tétreault, N., Tse, Y.C., Wong, T.P., Abdouh, M., and Bernier, G. (2019). Heterochromatic genome instability and neurodegeneration sharing similarities with Alzheimer's disease in old *Bmi1*^{+/-} mice. *Sci Rep* 9, 594. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37444-3>.
- Espuny-Camacho, I., Michelsen, K.A., Gall, D., Linaro, D., Hasche, A., Bonnefont, J., Bali, C., Orduz, D., Bilheu, A., Herpoel, A., et al. (2013). Pyramidal Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cells Integrate Efficiently into Mouse Brain Circuits In Vivo. *Neuron* 77, 440–456. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.011>.
- Espuny-Camacho, I., Arranz, A.M., Fiers, M., Snellinx, A., Ando, K., Munck, S., Bonnefont, J., Lambot, L., Corthout, N., Omodho, L., et al. (2017). Hallmarks of Alzheimer's Disease in Stem-Cell-Derived Human Neurons Transplanted into Mouse Brain. *Neuron* 93, 1066–1081.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.001>.
- Fitzpatrick, A.W.P., Falcon, B., He, S., Murzin, A.G., Murshudov, G., Garringer, H.J., Crowther, R.A., Ghetti, B., Goedert, M., and Scheres, S.H.W. (2017). Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease. *Nature* 547, 185–190. <https://doi.org/10.1038/nature23002>.
- Flamier, A., El Hajjar, J., Adjaye, J., Fernandes, K.J., Abdouh, M., and Bernier, G. (2018). Modeling Late-Onset Sporadic Alzheimer's Disease through BMI1 Deficiency. *Cell Reports* 23, 2653–2666. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.097>.

- Forner, S., Kawauchi, S., Balderrama-Gutierrez, G., Kramár, E.A., Matheos, D.P., Phan, J., Javonillo, D.I., Tran, K.M., Hingco, E., Da Cunha, C., et al. (2021). Systematic phenotyping and characterization of the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Data* 8, 270. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-01054-y>.
- Friedman, N.P., and Robbins, T.W. (2022). The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacol.* 47, 72–89. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01132-0>.
- Galasko, D., Xiao, M., Xu, D., Smirnov, D., Salmon, D.P., Dewit, N., Vanbrabant, J., Jacobs, D., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., et al. (2019). Synaptic biomarkers in CSF aid in diagnosis, correlate with cognition and predict progression in MCI and Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 5, 871–882. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2019.11.002>.
- Ghani, M.U., Mesadi, F., Kanık, S.D., Argunşah, A.Ö., Hobbiss, A.F., Israely, I., Ünay, D., Taşdizen, T., and Çetin, M. (2017). Dendritic spine classification using shape and appearance features based on two-photon microscopy. *Journal of Neuroscience Methods* 279, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.12.006>.
- Ghatak, S., Dolatabadi, N., Trudler, D., Zhang, X., Wu, Y., Mohata, M., Ambasadhan, R., Talantova, M., and Lipton, S.A. (2019). Mechanisms of hyperexcitability in Alzheimer's disease hiPSC-derived neurons and cerebral organoids vs isogenic controls. *ELife* 8, e50333. <https://doi.org/10.7554/eLife.50333>.
- Götz, J., Bodea, L.-G., and Goedert, M. (2018). Rodent models for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 19, 583–598. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0054-8>.
- Gouder, L., Vitrac, A., Goubran-Botros, H., Danckaert, A., Tinevez, J.-Y., André-Leroux, G., Atanasova, E., Lemièrre, N., Biton, A., Leblond, C.S., et al. (2019). Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying de novo SHANK3 mutations. *Sci Rep* 9, 94. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36993-x>.
- Graff-Radford, J., Yong, K.X.X., Apostolova, L.G., Bouwman, F.H., Carrillo, M., Dickerson, B.C., Rabinovici, G.D., Schott, J.M., Jones, D.T., and Murray, M.E. (2021). New insights into atypical Alzheimer's disease in the era of biomarkers. *The Lancet Neurology* 20, 222–234. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30440-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30440-3).

Gremer, L., Schölzel, D., Schenk, C., Reinartz, E., Labahn, J., Ravelli, R.B.G., Tusche, M., Lopez-Iglesias, C., Hoyer, W., Heise, H., et al. (2017). Fibril structure of amyloid- β (1–42) by cryo-electron microscopy. *Science* 358, 116–119. <https://doi.org/10.1126/science.aao2825>.

Griffiths, J., and Grant, S.G.N. (2023). Synapse pathology in Alzheimer's disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 139, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.05.028>.

Guo, T., Noble, W., and Hanger, D.P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol* 133, 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>.

Guo, T., Zhang, D., Zeng, Y., Huang, T.Y., Xu, H., and Zhao, Y. (2020). Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegeneration* 15, 40. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00391-7>.

Hampel, H., Hardy, J., Blennow, K., Chen, C., Perry, G., Kim, S.H., Villemagne, V.L., Aisen, P., Vendruscolo, M., Iwatsubo, T., et al. (2021). The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry* 26, 5481–5503. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01249-0>.

Hanger, D.P., Anderton, B.H., and Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine* 15, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.01.003>.

Hanna, R., Flamier, A., Barabino, A., and Bernier, G. (2021). G-quadruplexes originating from evolutionary conserved L1 elements interfere with neuronal gene expression in Alzheimer's disease. *Nat Commun* 12, 1828. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22129-9>.

Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 256, 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>.

Harman, D. (1956). AGING: A THEORY BASED ON FREE RADICAL AND RADIATION CHEMISTRY.

Hering, H., and Sheng, M. (2001). Dendritic spines : structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2, 880–888. <https://doi.org/10.1038/35104061>.

Hippius, H., and Neundörfer, G. (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 5, 101–108. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2003.5.1/hhippius>.

Hogan, R., Flamier, A., Nardini, E., and Bernier, G. (2020). The Role of BMI1 in Late-Onset Sporadic Alzheimer's Disease. *Genes* 11, 825. <https://doi.org/10.3390/genes11070825>.

Hong, S., Hwang, D.-Y., Yoon, S., Isacson, O., Ramezani, A., Hawley, R.G., and Kim, K.-S. (2007). Functional Analysis of Various Promoters in Lentiviral Vectors at Different Stages of In Vitro Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Molecular Therapy* 15, 1630–1639. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300251>.

Ittner, L.M., Klugmann, M., and Ke, Y.D. (2019). Adeno-associated virus-based Alzheimer's disease mouse models and potential new therapeutic avenues. *Br J Pharmacol* 176, 3649–3665. <https://doi.org/10.1111/bph.14637>.

Jabaudon, D. (2017). Fate and freedom in developing neocortical circuits. *NATURE COMMUNICATIONS* 9. .

Jack, C.R., Bennett, D.A., Blennow, K., Carrillo, M.C., Dunn, B., Haeberlein, S.B., Holtzman, D.M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., et al. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 14, 535–562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>.

Jacobs, J.J.L., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and Van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397, 164–168. <https://doi.org/10.1038/16476>.

Janeiro, M.H., Ardanaz, C.G., Sola-Sevilla, N., Dong, J., Cortés-Erice, M., Solas, M., Puerta, E., and Ramírez, M.J. (2021). Biomarkers in Alzheimer's disease. *Advances in Laboratory Medicine / Avances En Medicina de Laboratorio* 2, 27–37. <https://doi.org/10.1515/almed-2020-0090>.

John, A., and Reddy, P.H. (2021). Synaptic basis of Alzheimer's disease: Focus on synaptic amyloid beta, P-tau and mitochondria. *Ageing Research Reviews* 65, 101208. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101208>.

Kassis, J.A., Kennison, J.A., and Tamkun, J.W. (2017). Polycomb and Trithorax Group Genes in *Drosophila*. *Genetics* 206, 1699–1725. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185116>.

Katsimpardi, L., and Lledo, P.-M. (2018). Regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *Current Opinion in Neurobiology* 53, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.07.006>.

- Katsimpardi, L., Litterman, N.K., Schein, P.A., Miller, C.M., Loffredo, F.S., Wojtkiewicz, G.R., Chen, J.W., Lee, R.T., Wagers, A.J., and Rubin, L.L. (2014). Vascular and Neurogenic Rejuvenation of the Aging Mouse Brain by Young Systemic Factors. *Science* 344, 630–634. <https://doi.org/10.1126/science.1251141>.
- Kim, N. (2023). G4-interacting proteins endangering genomic stability at G4 DNA-forming sites. *Biochemical Society Transactions* 51, 403–413. <https://doi.org/10.1042/BST20221018>.
- Kim, D., Jun, Y., Kim, D., and Kim, J.-J. (2015). Effect of BMI1 Knockdown on Cell Proliferation, Apoptosis, Invasiveness, and Migration of U251 Glioma Cells. *Korean J Phys Anthropol* 28, 69. <https://doi.org/10.11637/kjpa.2015.28.2.69>.
- Kim, J.P., Kim, B.-H., Bice, P.J., Seo, S.W., Bennett, D.A., Saykin, A.J., Nho, K., and for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2021). BMI1 is associated with CSF amyloid- β and rates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Alz Res Therapy* 13, 164. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00906-4>.
- Klappenbach, C.M., Wang, Q., Jensen, A.L., Glodosky, N.C., and Delevich, K. (2023). Sex and timing of gonadectomy relative to puberty interact to influence weight, body composition, and feeding behaviors in mice. *Hormones and Behavior* 151, 105350. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2023.105350>.
- Kloske, C.M., and Wilcock, D.M. (2020). The Important Interface Between Apolipoprotein E and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Front. Immunol.* 11, 754. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00754>.
- Kollmer, M., Close, W., Funk, L., Rasmussen, J., Bsoul, A., Schierhorn, A., Schmidt, M., Sigurdson, C.J., Jucker, M., and Fändrich, M. (2019). Cryo-EM structure and polymorphism of A β amyloid fibrils purified from Alzheimer's brain tissue. *Nat Commun* 10, 4760. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12683-8>.
- Koukouli, F., Rooy, M., and Maskos, U. (2016). Early and progressive deficit of neuronal activity patterns in a model of local amyloid pathology in mouse prefrontal cortex. *Aging* 8, 3430–3449. <https://doi.org/10.18632/aging.101136>.
- Lauretti, E., Dincer, O., and Praticò, D. (2020). Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1867, 118664. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118664>.

- Leng, F., and Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol* 17, 157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>.
- Lepski, G., Jannes, C.E., Nikkhah, G., and Bischofberger, J. (2013). cAMP promotes the differentiation of neural progenitor cells in vitro via modulation of voltage-gated calcium channels. *Front. Cell. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00155>.
- Li, H., Liefke, R., Jiang, J., Kurland, J.V., Tian, W., Deng, P., Zhang, W., He, Q., Patel, D.J., Bulyk, M.L., et al. (2017). Polycomb-like proteins link the PRC2 complex to CpG islands. *Nature* 549, 287–291. <https://doi.org/10.1038/nature23881>.
- Libertini, G. (2019). Aging Definition. In *Encyclopedia of Gerontology and Population Aging*, D. Gu, and M.E. Dupre, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–10.
- Linaro, D., Vermaercke, B., Iwata, R., Ramaswamy, A., Libé-Philippot, B., Boubakar, L., Davis, B.A., Wierda, K., Davie, K., Poovathingal, S., et al. (2019). Xenotransplanted Human Cortical Neurons Reveal Species-Specific Development and Functional Integration into Mouse Visual Circuits. *Neuron* 104, 972-986.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.10.002>.
- Liu, C.-C., Zhao, N., Fu, Y., Wang, N., Linares, C., Tsai, C.-W., and Bu, G. (2017). ApoE4 Accelerates Early Seeding of Amyloid Pathology. *Neuron* 96, 1024-1032.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.11.013>.
- Liu, Z., Cashion, L.M., and Twu, J.J. (1997). A Systematic Comparison of Relative Promoter/Enhancer Activities in Mammalian Cell Lines. *Analytical Biochemistry* 246, 150–152. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2015>.
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., et al. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet* 396, 413–446. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6).
- Llach Pou, Thiberge, Van Der Zwan, M., Devi Govindan, A., Pons, S., Maskos, U., and Cloëz-Tayarani, I. (2023). Developmental Changes of Human Neural Progenitor Cells Grafted into the Ventricular System and Prefrontal Cortex of Mouse Brain in Utero. *Cells* 12, 1067. <https://doi.org/10.3390/cells12071067>.
- Locci, A., Orellana, H., Rodriguez, G., Gottliebson, M., McClarty, B., Dominguez, S., Keszycki, R.,

and Dong, H. (2021). Comparison of memory, affective behavior, and neuropathology in APPNLGF knock-in mice to 5xFAD and APP/PS1 mice. *Behavioural Brain Research* 404, 113192. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113192>.

Lodato, M.A., Rodin, R.E., Bohrson, C.L., Coulter, M.E., Barton, A.R., Kwon, M., Sherman, M.A., Vitzthum, C.M., Luquette, L.J., Yandava, C.N., et al. (2018). Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. *Science* 359, 555–559. <https://doi.org/10.1126/science.aao4426>.

Longo, V.D., Mitteldorf, J., and Skulachev, V.P. (2005). Programmed and altruistic ageing. *Nat Rev Genet* 6, 866–872. <https://doi.org/10.1038/nrg1706>.

Mancuso, R., Van Den Daele, J., Fattorelli, N., Wolfs, L., Balusu, S., Burton, O., Liston, A., Sierksma, A., Fourne, Y., Poovathingal, S., et al. (2019). Stem-cell-derived human microglia transplanted in mouse brain to study human disease. *Nat Neurosci* 22, 2111–2116. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0525-x>.

Matejuk, A., and Ransohoff, R.M. (2020). Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Front. Immunol.* 11, 1416. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01416>.

McGinty, R.K., Henrici, R.C., and Tan, S. (2014). Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. *Nature* 514, 591–596. <https://doi.org/10.1038/nature13890>.

McKhann, G.M., Knopman, D.S., Chertkow, H., Hyman, B.T., Jack, C.R., Kawas, C.H., Klunk, W.E., Koroshetz, W.J., Manly, J.J., Mayeux, R., et al. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia* 7, 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>.

Merlo, S., Spampinato, S.F., Caruso, G.I., and Sortino, M.A. (2020). The Ambiguous Role of Microglia in A β Toxicity: Chances for Therapeutic Intervention. *CN* 18, 446–455. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200131105418>.

Miller, J.D., Ganat, Y.M., Kishinevsky, S., Bowman, R.L., Liu, B., Tu, E.Y., Mandal, P.K., Vera, E., Shim, J., Kriks, S., et al. (2013). Human iPSC-Based Modeling of Late-Onset Disease via Progerin-Induced Aging. *Cell Stem Cell* 13, 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.006>.

Müller, U.C., Deller, T., and Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci* 18, 281–298. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>.

Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., and Nakashima, K. (2009). Committed Neuronal Precursors Confer Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells. *Developmental Cell* 16, 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.12.014>.

Nardini, E., Hogan, R., Flamier, A., and Bernier, G. (2021). Alzheimer’s disease: a tale of two diseases? *Neural Regen Res* 16, 1958. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.308070>.

Nato, G., Corti, A., Parmigiani, E., Jachetti, E., Lecis, D., Colombo, M.P., Delia, D., Buffo, A., and Magrassi, L. (2021). Immune-tolerance to human iPS-derived neural progenitors xenografted into the immature cerebellum is overridden by species-specific differences in differentiation timing. *Sci Rep* 11, 651. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79502-9>.

Navarro, C.L., Poitelon, Y., and Lévy, N. (2008). Lamines A et syndromes progéroïdes: Une farnésylation persistante aux conséquences dramatiques. *Med Sci (Paris)* 24, 833–840. <https://doi.org/10.1051/medsci/20082410833>.

Neu, S.C., Pa, J., Kukull, W., Beekly, D., Kuzma, A., Gangadharan, P., Wang, L.-S., Romero, K., Arneric, S.P., Redolfi, A., et al. (2017). Apolipoprotein E Genotype and Sex Risk Factors for Alzheimer Disease: A Meta-analysis. *JAMA Neurol* 74, 1178. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.2188>.

Nichols, E., Steinmetz, J.D., Vollset, S.E., Fukutaki, K., Chalek, J., Abd-Allah, F., Abdoli, A., Abualhasan, A., Abu-Gharbieh, E., Akram, T.T., et al. (2022). Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Public Health* 7, e105–e125. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00249-8).

Ochalek, A., Mihalik, B., Avci, H.X., Chandrasekaran, A., Téglási, A., Bock, I., Giudice, M.L., Tancos, Z., Molnár, K., László, L., et al. (2017). Neurons derived from sporadic Alzheimer’s disease iPSCs reveal elevated TAU hyperphosphorylation, increased amyloid levels, and GSK3B activation. *Alz Res Therapy* 9, 90. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0317-z>.

Papaspypopoulos, A., Tsolaki, M., Foroglou, N., and Pantazaki, A.A. (2020). Modeling and Targeting Alzheimer’s Disease With Organoids. *Front. Pharmacol.* 11, 396. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00396>.

- Paşca, S.P., Arlotta, P., Bateup, H.S., Camp, J.G., Cappello, S., Gage, F.H., Knoblich, J.A., Kriegstein, A.R., Lancaster, M.A., Ming, G.-L., et al. (2022). A nomenclature consensus for nervous system organoids and assembloids. *Nature* 609, 907–910. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05219-6>.
- Petros, T.J., Tyson, J.A., and Anderson, S.A. (2011). Pluripotent Stem Cells for the Study of CNS Development. *Front. Mol. Neurosci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00030>.
- Plath, K., Fang, J., Mlynarczyk-Evans, S.K., Cao, R., Worringer, K.A., Wang, H., De La Cruz, C.C., Otte, A.P., Panning, B., and Zhang, Y. (2003). Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation. *Science* 300, 131–135. <https://doi.org/10.1126/science.1084274>.
- Porsteinsson, A.P., Isaacson, R.S., Knox, S., Sabbagh, M.N., and Rubino, I. (2021). Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *J Prev Alz Dis* 1–16. <https://doi.org/10.14283/jpad.2021.23>.
- Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell* 159, 896–910. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010>.
- Revah, O., Gore, F., Kelley, K.W., Andersen, J., Sakai, N., Chen, X., Li, M.-Y., Birey, F., Yang, X., Saw, N.L., et al. (2022). Maturation and circuit integration of transplanted human cortical organoids. *Nature* 610, 319–326. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05277-w>.
- Roher, A.E., Kokjohn, T.A., Clarke, S.G., Sierks, M.R., Maarouf, C.L., Serrano, G.E., Sabbagh, M.S., and Beach, T.G. (2017). APP/A β structural diversity and Alzheimer's disease pathogenesis. *Neurochemistry International* 110, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.08.007>.
- Rolls, E.T. (2019). The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. *Brain Struct Funct* 224, 3001–3018. <https://doi.org/10.1007/s00429-019-01945-2>.
- Rubenstein, J.L.R. (2011). Annual Research Review: Development of the cerebral cortex: implications for neurodevelopmental disorders: Development of the cerebral cortex. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 52, 339–355. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.2010.02307.x>.
- Rujeedawa, T., Carrillo Félez, E., Clare, I.C.H., Fortea, J., Strydom, A., Rebillat, A.-S., Coppus, A., Levin, J., and Zaman, S.H. (2021). The Clinical and Neuropathological Features of Sporadic (Late-Onset) and Genetic Forms of Alzheimer's Disease. *JCM* 10, 4582.

<https://doi.org/10.3390/jcm10194582>.

Saito, T., Mihira, N., Matsuba, Y., Sasaguri, H., Hashimoto, S., Narasimhan, S., Zhang, B., Murayama, S., Higuchi, M., Lee, V.M.Y., et al. (2019). Humanization of the entire murine Mapt gene provides a murine model of pathological human tau propagation. *Journal of Biological Chemistry* 294, 12754–12765. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009487>.

Saleem, S., and Kannan, R.R. (2018). Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. *Cell Death Discov.* 4, 45. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0109-7>.

Sampath, D., Sathyanesan, M., and Newton, S. (2017). Cognitive dysfunction in major depression and Alzheimer's disease is associated with hippocampus–prefrontal cortex dysconnectivity. *NDT Volume 13*, 1509–1519. <https://doi.org/10.2147/NDT.S136122>.

Sanchez-Varo, R., Sanchez-Mejias, E., Fernandez-Valenzuela, J.J., De Castro, V., Mejias-Ortega, M., Gomez-Arboledas, A., Jimenez, S., Sanchez-Mico, M.V., Trujillo-Estrada, L., Moreno-Gonzalez, I., et al. (2021). Plaque-Associated Oligomeric Amyloid-Beta Drives Early Synaptotoxicity in APP/PS1 Mice Hippocampus: Ultrastructural Pathology Analysis. *Front. Neurosci.* 15, 752594. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.752594>.

Sanchez-Varo, R., Mejias-Ortega, M., Fernandez-Valenzuela, J.J., Nuñez-Díaz, C., Caceres-Palomo, L., Vegas-Gomez, L., Sanchez-Mejias, E., Trujillo-Estrada, L., Garcia-Leon, J.A., Moreno-Gonzalez, I., et al. (2022). Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: An Integrative Analysis. *IJMS* 23, 5404. <https://doi.org/10.3390/ijms23105404>.

Savonenko, A.V., Wong, P.C., and Li, T. (2023). Alzheimer diseases. In *Neurobiology of Brain Disorders*, (Elsevier), pp. 313–336.

Scesa, G., Adami, R., and Bottai, D. (2021). iPSC Preparation and Epigenetic Memory: Does the Tissue Origin Matter? *Cells* 10, 1470. <https://doi.org/10.3390/cells10061470>.

Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C.E., Cummings, J., and van der Flier, W.M. (2021). Alzheimer's disease. *The Lancet* 397, 1577–1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4).

Schmeer, Kretz, Wengerodt, Stojiljkovic, and Witte (2019). Dissecting Aging and Senescence—Current

Concepts and Open Lessons. *Cells* 8, 1446. <https://doi.org/10.3390/cells8111446>.

Schuettengruber, B., Bourbon, H.-M., Di Croce, L., and Cavalli, G. (2017). Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell* 171, 34–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002>.

Sengoku, R. (2020). Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology* 40, 22–29. <https://doi.org/10.1111/neup.12626>.

Serrano-Pozo, A., Das, S., and Hyman, B.T. (2021). APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *The Lancet Neurology* 20, 68–80. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30412-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30412-9).

Shi, Y., Inoue, H., Wu, J.C., and Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 16, 115–130. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>.

Shultz, L.D., Ishikawa, F., and Greiner, D.L. (2007). Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7, 118–130. <https://doi.org/10.1038/nri2017>.

Song, C., Shi, J., Zhang, P., Zhang, Y., Xu, J., Zhao, L., Zhang, R., Wang, H., and Chen, H. (2022). Immunotherapy for Alzheimer's disease: targeting β -amyloid and beyond. *Transl Neurodegener* 11, 18. <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00292-3>.

Song, W.M., Joshita, S., Zhou, Y., Ulland, T.K., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2018). Humanized TREM2 mice reveal microglia-intrinsic and -extrinsic effects of R47H polymorphism. *Journal of Experimental Medicine* 215, 745–760. <https://doi.org/10.1084/jem.20171529>.

Sproul, A.A., Jacob, S., Pre, D., Kim, S.H., Nestor, M.W., Navarro-Sobrinho, M., Santa-Maria, I., Zimmer, M., Aubry, S., Steele, J.W., et al. (2014). Characterization and Molecular Profiling of PSEN1 Familial Alzheimer's Disease iPSC-Derived Neural Progenitors. *PLoS ONE* 9, e84547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084547>.

Steele, O.G., Stuart, A.C., Minkley, L., Shaw, K., Bonnar, O., Anderle, S., Penn, A.C., Rusted, J., Serpell, L., Hall, C., et al. (2022). A multi-hit hypothesis for an *APOE4* -dependent pathophysiological state. *Eur J of Neuroscience* 56, 5476–5515. <https://doi.org/10.1111/ejn.15685>.

Stielow, B., Finkernagel, F., Stiewe, T., Nist, A., and Suske, G. (2018). MGA, L3MBTL2 and E2F6 determine genomic binding of the non-canonical Polycomb repressive complex PRC1.6. *PLoS Genet*

14, e1007193. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007193>.

Takahashi, R.H., Nagao, T., and Gouras, G.K. (2017). Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease: Intraneuronal accumulation of β -amyloid. *Pathol Int* 67, 185–193. <https://doi.org/10.1111/pin.12520>.

Teunissen, C.E., Verberk, I.M.W., Thijssen, E.H., Vermunt, L., Hansson, O., Zetterberg, H., Van Der Flier, W.M., Mielke, M.M., and Del Campo, M. (2022). Blood-based biomarkers for Alzheimer's disease: towards clinical implementation. *The Lancet Neurology* 21, 66–77. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00361-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00361-6).

Thiberge, Llach Pou, Vitrac, A., Maskos, U., and Cloëz-Tayarani, I. (2022). Humanized Chimeric Mouse Models to Study Human Neural Development and Pathogenesis of Brain Diseases. In *Translational Research Methods in Neurodevelopmental Disorders*, S. Martin, and F. Laumonnier, eds. (New York, NY: Springer US), pp. 135–158.

Tollervey, J.R., and Lunyak, V.V. (2012). Epigenetics: Judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics* 7, 823–840. <https://doi.org/10.4161/epi.21141>.

Tsuda, L., and Lim, Y.-M. (2018). Alzheimer's Disease Model System Using *Drosophila*. In *Drosophila Models for Human Diseases*, M. Yamaguchi, ed. (Singapore: Springer Singapore), pp. 25–40.

United Nation (2020). *World population ageing, 2019 highlights* (New York: United Nations).

Van Den Ameele, J., Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., and Espuny-Camacho, I. (2014). Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells. *Trends in Neurosciences* 37, 334–342. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.005>.

Van Der Kant, R., Goldstein, L.S.B., and Ossenkoppele, R. (2020). Amyloid- β -independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 21, 21–35. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0240-3>.

Van Der Lugt, N.M., Domen, J., Linders, K., Van Roon, M., Robanus-Maandag, E., Te Riele, H., Van Der Valk, M., Deschamps, J., Sofroniew, M., and Van Lohuizen, M. (1994). Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene. *Genes Dev.* 8, 757–769. <https://doi.org/10.1101/gad.8.7.757>.

van der Kant, R., and Goldstein, L.S.B. (2015). Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein

from Development to Dementia. *Developmental Cell* 32, 502–515. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.022>.

Vera, E., Bosco, N., and Studer, L. (2016). Generating Late-Onset Human iPSC-Based Disease Models by Inducing Neuronal Age-Related Phenotypes through Telomerase Manipulation. *Cell Reports* 17, 1184–1192. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.062>.

Verdonk, F., Roux, P., Flamant, P., Fiette, L., Bozza, F.A., Simard, S., Lemaire, M., Plaud, B., Shorte, S.L., Sharshar, T., et al. (2016). Phenotypic clustering: a novel method for microglial morphology analysis. *J Neuroinflammation* 13, 153. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0614-7>.

Verkerke, M., Hol, E.M., and Middeldorp, J. (2021). Physiological and Pathological Ageing of Astrocytes in the Human Brain. *Neurochem Res* 46, 2662–2675. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03256-7>.

Vico Varela, E., Etter, G., and Williams, S. (2019). Excitatory-inhibitory imbalance in Alzheimer's disease and therapeutic significance. *Neurobiology of Disease* 127, 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.04.010>.

Villalba, A., Götz, M., and Borrell, V. (2021). The regulation of cortical neurogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 1–66.

Vitrac, A., Pons, S., Balkota, M., Lemièrre, N., Raïs, C., Bourgeois, J.-P., Maskos, U., Bourgeron, T., and Cloëz-Tayarani, I. (2020). A chimeric mouse model to study human iPSC-derived neurons: the case of a truncating SHANK3 mutation. *Sci Rep* 10, 13315. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70056-4>.

Wengerodt, D., Schmeer, C., Witte, O.W., and Kretz, A. (2019). Amitosenescence and Pseudomitosenescence: Putative New Players in the Aging Process. *Cells* 8, 1546. <https://doi.org/10.3390/cells8121546>.

Whiteley, J.T., Fernandes, S., Sharma, A., Mendes, A.P.D., Racha, V., Benassi, S.K., and Marchetto, M.C. (2022). Reaching into the toolbox: Stem cell models to study neuropsychiatric disorders. *Stem Cell Reports* 17, 187–210. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.12.015>.

Wilkins, H.M., and Swerdlow, R.H. (2017). Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Research Bulletin* 133, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.009>.

Wu, K., Woo, S.-M., Seo, S.-U., and Kwon, T.-K. (2021). Inhibition of BMI-1 Induces Apoptosis

through Downregulation of DUB3-Mediated Mcl-1 Stabilization. *IJMS* 22, 10107. <https://doi.org/10.3390/ijms221810107>.

Xu, G., Ran, Y., Fromholt, S.E., Fu, C., Yachnis, A.T., Golde, T.E., and Borchelt, D.R. (2015). Murine A β over-production produces diffuse and compact Alzheimer-type amyloid deposits. *Acta Neuropathol Commun* 3, 72. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0252-9>.

Zetterberg, H., and Bendlin, B.B. (2021). Biomarkers for Alzheimer's disease—preparing for a new era of disease-modifying therapies. *Mol Psychiatry* 26, 296–308. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0721-9>.

Zhang, T., Cooper, S., and Brockdorff, N. (2015). The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Rep* 16, 1467–1481. <https://doi.org/10.15252/embr.201540945>.

Zhao, J., Fu, Y., Yamazaki, Y., Ren, Y., Davis, M.D., Liu, C.-C., Lu, W., Wang, X., Chen, K., Cherukuri, Y., et al. (2020). APOE4 exacerbates synapse loss and neurodegeneration in Alzheimer's disease patient iPSC-derived cerebral organoids. *Nat Commun* 11, 5540. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19264-0>.

Zhao, Y., Wu, X., Li, X., Jiang, L.-L., Gui, X., Liu, Y., Sun, Y., Zhu, B., Piña-Crespo, J.C., Zhang, M., et al. (2018). TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron* 97, 1023-1031.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.031>.

Zhao, Y., Yang, W., Zheng, K., Chen, J., and Jin, X. (2023). The role of BMI1 in endometrial cancer and other cancers. *Gene* 856, 147129. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.147129>.

Ouvrages :

NeuroSciences 6ème Edition, Purves, Augustine, Fitzpatrick chez De Boeck Supérieur, 2019 ISBN 2807314929

Sitographie

<https://www.who.int/fr/initiatives/decade-of-healthy-ageing>

<https://www.alz.org/>

https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/undesa_2020_world_population_ageing_highlights.pdf

<https://www.has-sante.fr/>

<https://alzheimer-recherche.org/>

