

Université de Montréal

Étude du rôle de Pax6 dans la gliogenèse

par

Enrica Cannizzaro

Programme de biologie moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en Biologie Moléculaire

août, 2010

© Enrica Cannizzaro, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé:

Étude du rôle de Pax6 dans la gliogenèse

Présenté par :

Enrica Cannizzaro

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Estelle Schmitt, président-rapporteur

Gilbert Bernier, directeur de recherche

Janetta Bijl, membre du jury

Résumé

Les astrocytes sont des cellules gliales présentes dans le système nerveux central, qui exercent de nombreuses fonctions physiologiques essentielles et sont impliquées dans la réponse aux lésions et dans plusieurs pathologies du cerveau. Les astrocytes sont générés par les cellules de la glie radiale, les précurseurs communs de la plupart des cellules neuronales et gliales du cerveau, après le début de la production des neurones. Le passage de la neurogenèse à la gliogenèse est le résultat de mécanismes moléculaires complexes induits par des signaux intrinsèques et extrinsèques responsables du changement de propriété des précurseurs et de leur spécification. Le gène Pax6 code pour un facteur de transcription hautement conservé, impliqué dans plusieurs aspects du développement du système nerveux central, tels que la régionalisation et la neurogenèse. Il est exprimé à partir des stades les plus précoces dans les cellules neuroépithéliales (les cellules souches neurales) et dans la glie radiale, dérivant de la différenciation de ces cellules. L'objectif de cette étude est d'analyser le rôle de Pax6 dans la différenciation et dans le développement des astrocytes. À travers l'utilisation d'un modèle murin mutant nul pour Pax6, nous avons obtenu des résultats suggérant que la suppression de ce gène cause l'augmentation de la prolifération et de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches neurales embryonnaires. *In vitro*, les cellules mutantes prolifèrent de façon aberrante et sous-expriment les gènes p57^{Kip2}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf} et p21^{Cip1}, qui inhibent la progression du cycle cellulaire. De plus, Pax6 promeut la différenciation astrocytaire des cellules souches neurales embryonnaires et est requis pour la différenciation des astrocytes dans la moëlle épinière. Les mutants nuls pour Pax6 meurent après la naissance à cause de graves défauts développementaux dus aux fonctions essentielles de ce gène dans le développement embryonnaire de plusieurs organes. En utilisant un modèle murin conditionnel basé sur le système CRE/ loxP (hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox}) qui présente l'inactivation de Pax6 dans les cellules de la glie radiale, viable après la naissance, nous avons montré que Pax6 est impliqué dans la maturation et dans le développement post-natal des astrocytes. Le cortex cérébral des souris mutantes conditionnelles ne présente pas d'astrocytes matures à l'âge de 16 jours et une très faible quantité d'astrocytes immatures à l'âge de trois mois, suggérant que Pax6 promeut la différenciation et la maturation des astrocytes. De plus, Pax6 semble

jouer un rôle même dans le processus de différenciation et de maturation de cellules gliales rétiniennes. L'étude des gènes et des mécanismes moléculaires impliqués dans la génération des astrocytes est crucial pour mieux comprendre le rôle physiologique et les altérations pathologiques des ces cellules.

Mots-clés: astrocytes, gliogénese, développement, système nerveux central, cellules souches neurales, Pax6, facteur de transcription, souris mutante nulle, souris mutante conditionnelle, système CRE/ loxP

Abstract

Astrocytes, a subtype of glial cells present in the central nervous system, have multiple physiological functions and are involved in the response to lesions and in several brain pathologies. Astrocytes are generated by radial glia cells, the common precursors of most neural and glial cells of the brain, after the beginning of neurons production. The transition from neurogenesis to gliogenesis is the result of complex molecular mechanisms induced by both intrinsic and extrinsic signals responsible for the change of precursors properties and commitment. The Pax6 gene encodes a highly conserved transcription factor, involved in several aspects of central nervous system development, such as regionalization and neurogenesis. It is expressed from the earliest stages in the neuroepithelial cells (neural stem cells) and in their more differentiated radial glia progeny. The aim of this study was to analyze the role of Pax6 in the differentiation and development of astrocytes. By using a Pax6 null mutant mouse, we obtained results suggesting that the suppression of this gene increases the proliferation and the self-renewal ability of embryonic neural stem cells. *In vitro* mutant cells overproliferate and overexpress p57^{Kip2}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf} et p21^{Cip1} genes, which inhibit the cell cycle progression. Moreover Pax6 promotes astrocytic differentiation of embryonic neural stem cells and is required for astrocyte differentiation in spinal cord. Pax6 null mutants die after birth because of severe developmental defects, due to the essential functions of this gene in embryonic development of several organs. Using a conditional mutant mouse of Pax6 in radial glia (hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox}, based on site-specific Cre/loxP-mediated gene excision), which is viable after birth, we obtained evidences showing that Pax6 is involved in astrocyte maturation and postnatal development. The cerebral cortex of sixteen-day-old conditional mutant mice doesn't present mature astrocytes, and the three-month-old mice cortex presents only few immature astrocytes, suggesting that Pax6 promotes astrocyte differentiation and maturation. Moreover Pax6 seems to play a role also in the maturation and differentiation of retinal glial cells. The identification of genes and molecular pathways involved in the generation

of astrocytes is crucial to better understand the physiological function and pathological alterations of these cells.

Keywords: astrocytes, gliogenesis, development, central nervous system, neural stem cells, Pax6, transcription factor, nul mutant mouse, conditional mutant mouse, CRE/ loxP system

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations et des sigles.....	xi
Remerciements.....	xvii
Introduction.....	1
1 Développement du système nerveux central chez la souris.....	1
1.1 Formation du tube neural.....	1
1.2 Différenciation du tube neural.....	4
1.2.1 Spécification antéro-postérieure et dorso-ventrale du tube neural.....	4
1.2.2 Développement de la rétine.....	5
1.2.3 Les cellules neuroépithéliales.....	6
1.2.4 Les progéniteurs basaux.....	9
1.2.5 La glie radiale.....	9
1.2.6 La génération et la différenciation des neurones.....	12
1.2.7 Les astrocytes.....	17
1.2.7.1 Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des astrocytes dans le cortex cérébral.....	17
1.2.7.2 Physiologie et fonctions des astrocytes.....	24
1.2.8 Génération des oligodendrocytes.....	28
1.2.9 Les cellules souches neurales adultes.....	29
1.2.9.1 Cellules souches neurales de la zone subventriculaire adulte.....	31
1.2.9.2 Cellules souches neurales de la zone subgranulaire du gyrus denté de l'hippocampe adulte.....	35

1.2.9.3 La niche des cellules souches neurales adultes: régulation de la neurogenèse dans le cerveau adulte	37
2 Pax6: un facteur de transcription conservé impliqué dans le développement	39
2.1 Les gènes Pax	39
2.2 Pax6: structure et isoformes	40
2.3 Pax6: expression et fonctions.....	44
2.4 Fonctions de Pax6 dans le développement du système nerveux central.....	46
2.4.1 Rôles de Pax6 dans la régionalisation du prosencéphale	46
2.4.2 Pax6 dans la neurogenèse.....	51
2.4.3 Expression et fonctions dans les astrocytes	60
Hypothèse de recherche et objectifs.....	62
Objectifs spécifiques	63
1.1 Évaluation du rôle de Pax6 dans la génération des astrocytes par les cellules souches neurales embryonnaires.	63
1.2 Évaluation du rôle de Pax6 dans le développement des astrocytes <i>in vivo</i>	63
Matériels et méthodes	65
1. Animaux	65
Détermination du génotype des souris	66
2. Culture de cellules souches neurales embryonnaires	67
3. Western Blot.....	68
4. Immunomarquage	69
4.1 Immunofluorescence sur sections congelées	69
4.2 Immunohistochimie sur sections paraffinées	70
5. PCR en temps réel.....	72
6. Analyses statistiques	74
Résultats	75
1. Rôle de Pax6 dans la génération des astrocytes pendant le développement embryonnaire.....	75

1.1 Pax6 contrôle la prolifération et la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches neurales embryonnaires	75
1.2 Les gènes régulateurs du cycle cellulaire sont sous-exprimés dans les neurosphères Pax6 ^{-/-}	78
1.3 Pax6 promeut la différenciation astrocytaire des cellules souches neurales embryonnaires	80
1.4 Pax6 est requis pour la différenciation des astrocytes dans la moëlle épinière	82
2. Étude du rôle de Pax6 dans le développement post-natal des astrocytes <i>in vivo</i>	84
2.1 Description du modèle expérimental: la souris mutante conditionnelle hGFAP-CRE/ Pax6 ^{flox/flox}	84
2.2 Étude du rôle de Pax6 dans la génération des astrocytes parenchymateux et des cellules souches neurales adultes du cortex cérébral	88
2.3 Rôle de Pax6 dans la génération des astrocytes et des cellules de Müller de la rétine.....	96
Discussion	102
1. Rôle de Pax6 lors de la différenciation astrocytaire des cellules souches neurales embryonnaires	102
2. Pax6 dans le développement post-natal des astrocytes	106
3. Perspectives	111
Conclusions	114
Bibliographie.....	115

Liste des tableaux

Tableau I: Marqueurs moléculaires des cellules neuroépithéliales, de la glie radiale et des astrocytes matures.....	11
---	----

Liste des figures

Figure 1: Induction neurale et neurulation primaire.	3
Figure 2: Représentation schématique illustrant la formation des différents types cellulaires au cours du développement du cerveau chez les mammifères.	8
Figure 3: Schéma illustrant le processus d'inhibition latérale déclenché par la voie Notch et son rôle dans la spécification et la différenciation neuronales.	14
Figure 4: Représentation schématique illustrant les principaux signaux environnementaux qui convergent dans l'induction de la génération des astrocytes.	20
Figure 5: Représentation schématique illustrant les mécanismes intrinsèques et les signaux environnementaux qui promeuvent la neurogenèse et répriment la gliogenèse pendant la période neurogénique.	23
Figure 6: Les sièges des cellules souches neurales adultes : la ZSV et la ZSG.	30
Figure 7: Architecture de la ZSV.	32
Figure 8: Architecture de la ZSG.	36
Figure 9: Structure de Pax6.	43
Figure 10: Profil d'expression de Pax6 dans le prosencéphale murin en développement de E8 à E15.5.	50
Figure 11: Schéma illustrant le circuit moléculaire régulé par Pax6 contrôlant l'auto-renouvellement et la neurogenèse dans les cellules souches neurales du cortex cérébral.	58
Figure 12: La suppression de Pax6 cause l'augmentation de la prolifération et de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches neurales embryonnaires.	77
Figure 13: Niveau d'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire dans les neurosphères Pax6 ^{-/-}	79
Figure 14: Pax6 promeut la différenciation astrocytaire des cellules souches neurales embryonnaires.	81
Figure 15: Pax6 est requis pour la différenciation des astrocytes dans la moëlle épinière. .	83

Figure 16: Génération des souris mutantes conditionnelles hGFAP-CRE /Pax6 ^{flox/flox}	85
Figure 17: Les souris mutantes conditionnelles hGFAP-CRE/ Pax6 ^{flox/flox} n'expriment pas Pax6 dans la zone subventriculaire.	90
Figure 18: Pax6 est requis pour la différenciation des astrocytes parenchymateux mais ne l'est pas pour la génération des cellules souches neurales adultes dans le cortex cérébral.	93
Figure 19: Le cortex des souris hGFAP-CRE/ Pax6 ^{flox/flox} présente des astrocytes immatures à l'âge adulte.	95
Figure 20: Pax6 promeut la différenciation des cellules de Müller et des astrocytes rétiniens.	98
Figure 21: La rétine de la souris mutante conditionnelle hGFAP-CRE/ Pax6 ^{flox/flox} présente des astrocytes et des cellules de Müller matures à l'âge de 90 jours.	101

Liste des abréviations et des sigles

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

bHLH : basic helix–loop–helix

BLBP : brain lipid-binding protein

BMP : bone morphogenetic protein

bp : base pairs

BrdU : bromodeoxyuridine

BSA : bovine serum albumin

BTSCs : brain tumor stem cells

cAMP : cyclic adenosine monophosphate

CBP : CREB binding protein

CCPA : Conseil Canadien de protection des Animaux

ChIP-chip : Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip

CMR : Courant de migration rostrale

CNTF : ciliary neurotrophic factor

CO₂ : carbonic dioxide

CREB: cAMP response element-binding

CT-1 : cardiotrophin-1

Cux : cut-like homeobox

DAB : 3,3'-diaminobenzidine

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DCX : doublecortin

Dll1: delta-like 1

Dlx : distal-less homeobox

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNMT1 : DNA methyltransferase 1
dNTP : désoxynucléotides triphosphates
DTT : dithiothréitol
Ebf3 : early B-cell factor 3
EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid
EGF : epidermal growth factor
EGFR : epidermal growth factor receptor
EGL : éminence ganglionnaire latérale
EGM : éminence ganglionnaire médiale
Emx : empty spiracles homeobox
ERK : extracellular signal-regulated kinases
Esr : Estrogen receptor
ey : eyeless
FGF-2 : fibroblast growth factor 2
flox : floxed allele
g : force gravitationnelle
GABA : γ -aminobutyric acid
Gadd45g : growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GLAST : glutamate-aspartate transporter
GLT-1 : glutamate transporter 1
gp130 : glycoprotein 130
Gsh2 : glutathione synthetase 2
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
Hepes : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Her : human epidermal growth factor receptor
Hes : hairy/ enhancer of split family
hGFAP : human glial fibrillary acidic protein

Id : inhibitor of DNA binding
IL-6 : interleukin 6
Isl1 : insulin gene enhancer binding protein 1
JAK: janus kinase
KCD : kinases cyclines-dépendantes
LeX : Lewis antigen X
Lhx8 : LIM homeobox protein 8
LIF : leukemia inhibitory factor
LIFR β : leukemia inhibitory factor receptor subunit β
MA : manteau
MAP3K7 : mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
Mash : mammalian achaete-scute homologue
Math : MATH (meprin-associated Traf homology) domain containing
mGFAP : mouse glial fibrillary acidic protein
mGlur : metabotropic glutamate receptor
M-MLV : moloney murine leukemia virus
Mnfg: manic fringe homolog
NCoR : nuclear receptor corepressor
NE : neuroépithélium
NeuN : neuronal nuclei
NeuroD : neurogenic differentiation
NFI : nuclear factor I
Ngn : neurogenin
NG2 : nerve/glial antigene 2
Nkx2.1 : NK2 homeobox 1
Nscl : neuronal stem cell leukemia
Olig : oligodendrocyte transcription factor
OMS : Organisation mondiale de la santé
PA : plaque alaire

Pax: paired box
PB : plaque basale
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PDGF : platelet-derived growth factor
PEDF : pigment epithelium-derived factor
pGNA : cassette galactosidase-neomycine
Phox: phenol oxidase
PIN : progéniteur intermédiaires neuronal
PKB : protein kinase B
PO : progéniteur des oligodendrocytes
PP : plaque du plancher
Prox1 : prospero-related homeobox 1
PSA-NCAM : polysialic acid - neural cell adhesion molecule
PST : domaine riche en proline, sérine et thréonine
PT : plaque du toit
PTEN : phosphatase and tensin homolog
RBP-J κ : recombinant binding protein-J κ
RMS : rostral migratory stream
RT : reverse transcriptase
Sey: small eyes
Sey^{Neu}: small eyes, Neuherberg
Shh : sonic hedgehog
SMAD : small mothers against decapentaplegic
Sox2 : sex determining region Y-box containing gene 2
Sstr2 : somatostatin receptor 2
STAT : signal transducers and activator of transcription
Svet1 : subventricular expressed transcript 1
SV40 : simian virus 40

S100 β : S100 protein β

TAB2 : TGF β activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2

TAE : Tris-acetate-EDTA

Tbr : T-box brain protein

TBS : Tris buffered saline

TGF β : transforming growth factor β

Tlx : tailless

TN-C: tenascin C

TNF α : tumor necrosis factor α

TOAD64 : turned on after division, 64 kDa

TRAF : tumor necrosis factor receptor-associated factor

VEGF : vascular endothelial growth factor

wt : wild-type

ZM : zone marginale

ZSG : zone subgranulaire

ZSV : zone subventriculaire

ZV : zone ventriculaire

À ma famille et à Cyril

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier mon directeur de recherche, le Dr Gilbert Bernier, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir confié un projet très prometteur. Je remercie également les autres étudiants et associés de recherche de mon laboratoire pour leurs conseils et support technique, particulièrement Nicolas Tétreault, le Dr Mohamed Abdouh, et le Dr Wassim Chatoo.

Merci à mes parents et aux autres membres de ma famille, pour m'avoir encouragée à poursuivre mes objectifs et pour m'avoir aimée et soutenue tout au long de ma vie. Un gros merci à mes amis en Europe, que je considère comme ma deuxième famille, pour leur présence et soutien incomparables et pour tous les beaux moments passés ensemble.

Enfin, je remercie la personne sans laquelle rien aurait été possible, qui a changé ma vie et qui en rend chaque moment merveilleux: merci à Cyril, pour son soutien, pour me donner toujours le sourire et pour m'aider à garder la force et l'optimisme dans les moments difficiles. Et surtout, merci pour son amour.

Introduction

1 Développement du système nerveux central chez la souris

1.1 Formation du tube neural

Les premiers signes de développement du système nerveux central apparaissent pendant la phase de gastrulation, quand, sous l'effet de signaux inductifs du mésoderme sous-jacent (induction verticale)¹ et du centre organisateur du nœud (induction planaire)², on observe la formation d'un épaissement médio-sagittale de l'ectoderme dorsale qui s'étend en direction cranio-caudale, la plaque neurale, constituée par un épithélium colonnaire^{3,4}. Le développement de la plaque neurale est plus rapide à l'extrémité crânienne, qui s'élargit en forme de raquette, et donne origine au futur cerveau. L'extrémité caudale reste étroite et formera la moëlle épinière (Figure 1A).

La subséquente formation du tube neural (le rudiment du système nerveux central) se produit à travers un processus appelé "neurulation". Deux types de neurulation produisent le tube neural: la portion antérieure se forme par neurulation primaire, où, par l'action inductrice du mésoblaste axial, de la chorde dorsale et de la plaque préchordale, les cellules de la plaque neurale prolifèrent, s'invaginent et se détachent de la surface en constituant un tube creux⁵ (Figure 1B). La partie postérieure du tube neurale se forme par neurulation secondaire, qui consiste en la coalescence des cellules mésenchymateuses en un cordon solide qui ensuite forme un tube par cavitation^{6,7}.

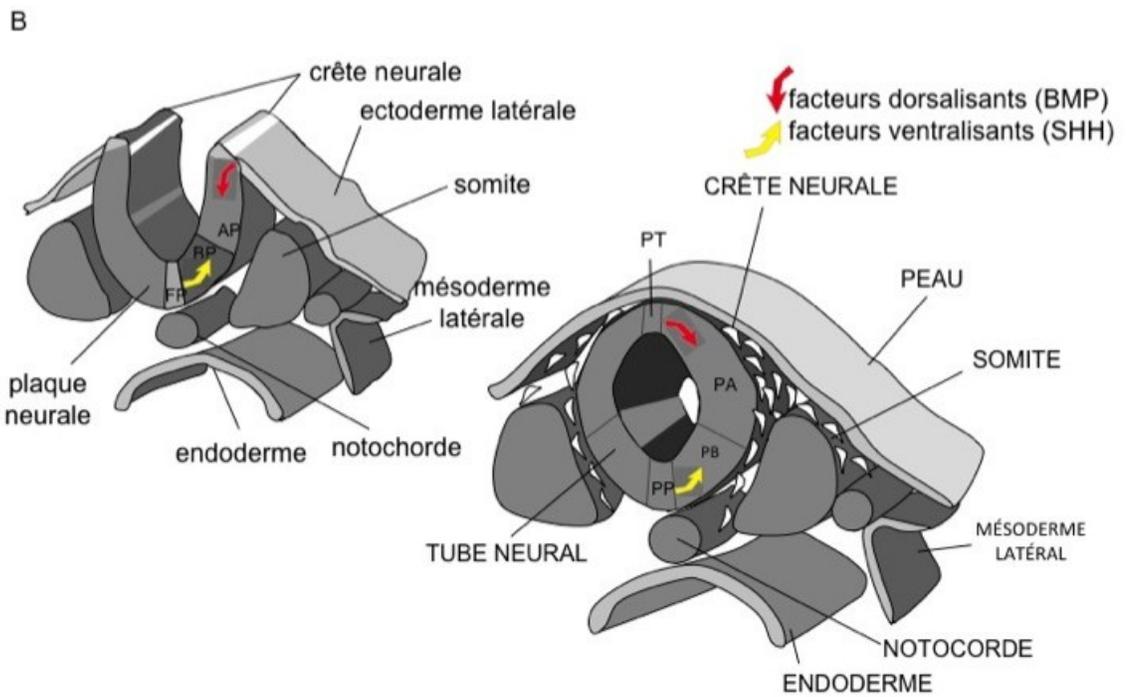
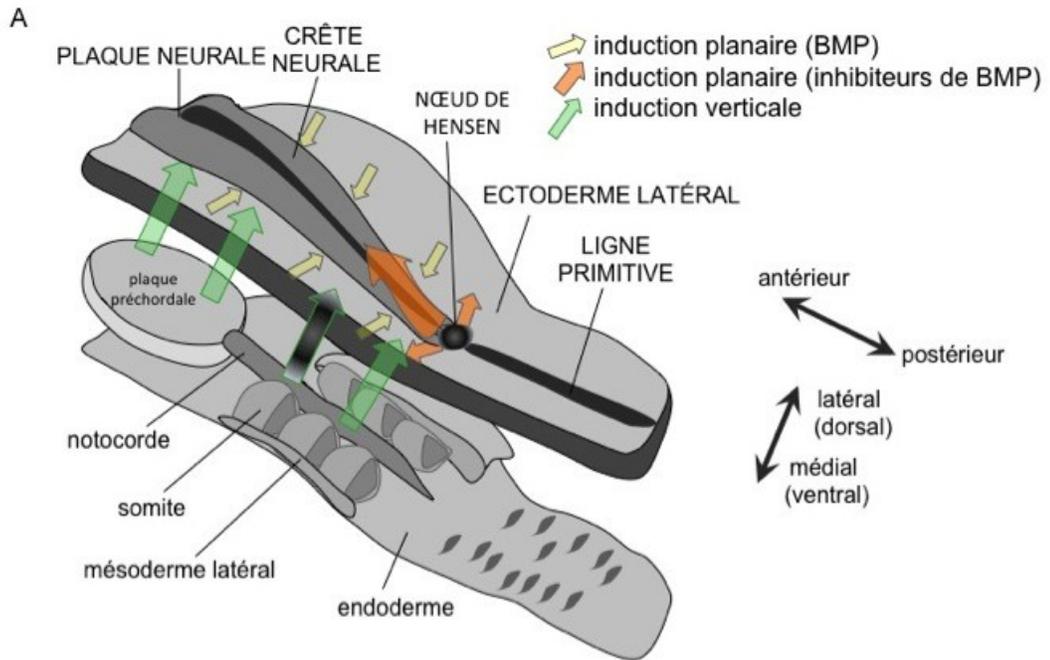


Figure 1: Induction neurale et neurulation primaire.

(A) Au stade de plaque neurale, l'induction verticale (flèches vertes) par le mésoderme axiale sous-jacent (notocorde et plaque préchordale) ainsi que l'induction planaire par le nœud de Hensen (flèches oranges) et l'ectoderme (flèches jaunes) régulent la polarité dorso-ventrale et les étapes initiales de la régionalisation antero-postérieure dans le neuroépithélium⁸. **(B)** Pendant la neurulation, les plis neuraux se ferment à la ligne médiane. Les cellules de la crête neurale délaminent et migrent avant la fermeture du tube neural pour aller constituer d'autres tissus spécialisés dans l'organisme, et la gouttière neurale devient le lumen du tube neural. L'information planaire par la ligne médiane ventrale (plaque du plancher, PP, flèche jaune) et la ligne médiane dorsale (plaque du toit, PT, flèche rouge) jouent un rôle fondamental dans l'établissement de la régionalisation dorso-ventrale en utilisant le facteur Shh (Sonic Hedgehog) et les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) comme signaux moléculaires⁸. Comme conséquence des événements inductifs, le tube neural est subdivisé en deux domaines columnaires: la plaque basale (PB, près de la plaque du planché) et la plaque alaire (PA, près de la plaque du toit). Adaptée de Vieira et al., 2010⁸.

1.2 Différenciation du tube neural

La différenciation du tube neural dans les différentes régions du système nerveux central se produit simultanément par des voies différentes: au niveau anatomique et tissulaire, le tube neural et son lumen se dilatent, se rétrécissent à certains endroits et forment les compartiments du cerveau et de la moëlle épinière, et les populations cellulaires du tube neural se réarrangent pour constituer les différentes régions fonctionnelles⁹. Au niveau cellulaire, les cellules qui constituent le tube neural (cellules neuroépithéliales) se différencient en neurones et cellules gliales.

1.2.1 Spécification antéro-postérieure et dorso-ventrale du tube neural

La partie antérieure du tube neural se dilate dans les trois vésicules primaires, le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale⁹. Le renflement primaire du cerveau embryonnaire est le résultat de la pression positive exercée par le fluide cérébrospinal contre les parois du tube neural¹⁰. Les vésicules primaires se subdivisent ensuite dans différentes régions selon l'axe antéro-postérieur (vésicules secondaires), qui formeront les différentes structures du système nerveux central au cours du développement embryonnaire⁹. La polarité dorso-ventrale du tube neural est induite par les signaux provenant des tissus environnants⁹. Le patron ventral est imposé par la notochorde, qui sécrète le facteur morphogène Shh (*sonic hedgehog*), alors que le patron dorsal est induit par l'épiderme, produisant un gradient de facteurs appartenant à la famille TGF- β (*transforming growth factor β*) (Figure 1B)⁸. Shh, sécrété par la notochorde, induit les cellules de la charnière médiale du tube neurale à former la plaque du plancher, qui sécrète aussi Shh, qui forme un gradient qui est plus élevé dans la portion ventrale du tube neural^{9,11,12}. Comme la notochorde, l'épiderme, exprimant les facteurs BMP4 et BMP7 (*bone morphogenetic proteins 4 et 7*) qui appartiennent à la famille TGF- β , établit un centre

de signalisation secondaire en induisant l'expression de BMP4 dans la plaque du toit du tube neural. BMP4 induit une cascade de facteurs appartenant à la famille TGF- β selon un gradient dorso-ventral dans les cellules adjacentes, qui sont donc exposées à différentes concentrations de facteurs dans des temps différents^{9,13}. Les facteurs paracrines interagissent pour initier la synthèse des différents facteurs de transcription qui déterminent la spécification de l'axe dorso-ventral du tube neural.

1.2.2 Développement de la rétine

La région de la plaque neurale qui formera les yeux, appelée champ optique, est séparée en deux champs bilatéraux par effet du facteur Shh, qui supprime l'expression des gènes pro-optiques dans le centre de cette région, divisant le champ en deux¹⁴. Chez la souris le développement de l'œil débute au jour embryonnaire 8,25 (E8,25), avec la formation de deux sillons de chaque côté de la ligne médiane à l'extrémité encore ouverte des plis neuraux antérieurs, les gouttières optiques. Lorsque le tube neural se ferme, au jour E9, les gouttières optiques se transforment en évaginations du tube neural et deviennent les deux vésicules optiques¹⁵. La pression du liquide contenu dans le tube neural va permettre l'expansion de ces vésicules, qui vont ainsi se développer et venir près de l'ectoderme. Au jour E9,5, le contact entre la vésicule optique et l'ectoderme de surface adjacent induit la transformation de l'ectoderme en placode optique, caractérisée par la prolifération et l'épaississement de l'ectoderme¹⁵. A son tour, le placode optique induit l'évagination de la vésicule optique en cupule optique au jour E10. La cupule optique est formée par deux couches: les cellules de la couche externe produisent la mélanine et forment l'épithélium pigmenté rétinien, les cellules de la couche interne génèrent des cellules ganglionnaires, des interneurons, des cellules gliales et des photorécepteurs sensibles à la lumière, qui dans l'ensemble constituent la rétine neurale⁹. La rétine neurale est organisée en différentes couches fonctionnelles: la couches des photorécepteurs (cônes et bâtonnets), la couche

plexiforme externe formée des cellules horizontales, la couche nucléaire interne formée des cellules bipolaires, la couche plexiforme interne formée des cellules amacrines et la couche des cellules ganglionnaires. Les interneurons bipolaires transmettent les stimulus électriques des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires, alors que les neurones amacrines et horizontaux transmettent les impulsions électriques dans le plan de la rétine. Les cellules ganglionnaires sont des neurones dont les axones envoient les impulsions électriques au cerveau: leurs axones se réunissent à la base de l'œil et parcourent le pédoncule optique, constituant le nerf optique. Les sept types de cellules dérivent des progéniteurs multipotents rétiniens¹⁶. Leur différenciation, qui produit de façon séquentielle les différents types cellulaires, est régulée par plusieurs facteurs dont les plus importants sont les facteurs homéodomaines (qui régulent la prolifération, la sortie du cycle cellulaire, la régionalisation et la multipotence), et les facteurs bHLH (*basic helix-loop-helix*), qui déterminent le destin cellulaire dans les couches^{17,18}.

1.2.3 Les cellules neuroépithéliales

À la fin de la neurulation et avant la neurogenèse, le tube neural est constitué d'une couche de cellules bipolaires polarisées qui s'étendent de la lamine basale au lumen ventriculaire du tube neural, étant à l'origine de toutes les cellules nerveuses et gliales du système nerveux central: les cellules neuroépithéliales. Ces cellules sont caractérisées par le mouvement alterné de leurs noyaux (migration nucléaire intercinétique) entre la surface basale et apicale, découvert en 1935¹⁹. La migration est synchronisée avec le cycle cellulaire: pendant la mitose, le noyau reste à la surface apicale, près du ventricule, migre vers la surface basale pendant la phase G1, rejoint la position la plus basale en phase S et ensuite retourne vers la surface apicale durant la phase G2. Puisque les cellules ne sont pas synchronisées entre elles et qu'à tout moment il y a des cellules dans toutes les possibles phases du cycle, l'épithélium apparaît pseudostratifié²⁰. Certaines protéines, comme la

prominine-1 (CD133) se trouvent sélectivement dans la membrane plasmatique apicale²¹, alors que les jonctions serrées et les jonctions adhérentes sont présentes à l'extrémité la plus apicale de la membrane latérale²²⁻²⁴, et les constituants des récepteurs pour la lamine basale, comme les intégrines α , sont concentrés dans la membrane basale²⁵.

Avant la neurogenèse, les cellules neuroépithéliales se divisent symétriquement produisant deux progéniteurs identiques et par conséquent incrémentent leur nombre²⁶. Avec la progression du développement, ces cellules subissent des changements dans leur patron d'expression génique, dans leurs caractéristiques cytologiques et dans leur potentiel de différenciation²⁰. Le premier changement phénotypique (qui se passe aux jours E9/E10 du développement embryonnaire du télencéphale) consiste dans l'induction du filament intermédiaire nestine²⁷, de l'antigène corrélé reconnu par l'anticorps RC2²⁸ (des évidences montrent que l'anticorps anti-RC2 reconnaît une modification post-traductionnelle de la nestine²⁹) et de l'antigène reconnu par l'anticorps RC1³⁰. Les jonctions intercellulaires sont perdues (mais pas les jonctions adhérentes), suite à la sous-régulation de l'occludine, une composante des jonctions serrées²². De plus, les cellules réduisent le transport apico/ basal de certaines protéines de la membrane plasmatique³¹.

A partir de ce stade, les cellules commencent à se diviser de façon asymétrique, produisant une autre cellule neuroépithéliale et un neurone, ou, en alternative, un progéniteur qui effectuera sa mitose à une distance significative de la surface ventriculaire et qui générera deux neurones à travers une division symétrique (progéniteur basal)³² (Figure 2). Peu de temps après l'apparition des premiers neurones, les cellules neuroépithéliales subissent un deuxième changement et acquièrent des caractéristiques moléculaires et cytologiques typiques de la lignée astrogliale, produisant les cellules de la glie radiale²⁰, qui sont à l'origine à la fois des neurones et des cellules gliales^{30,33}.

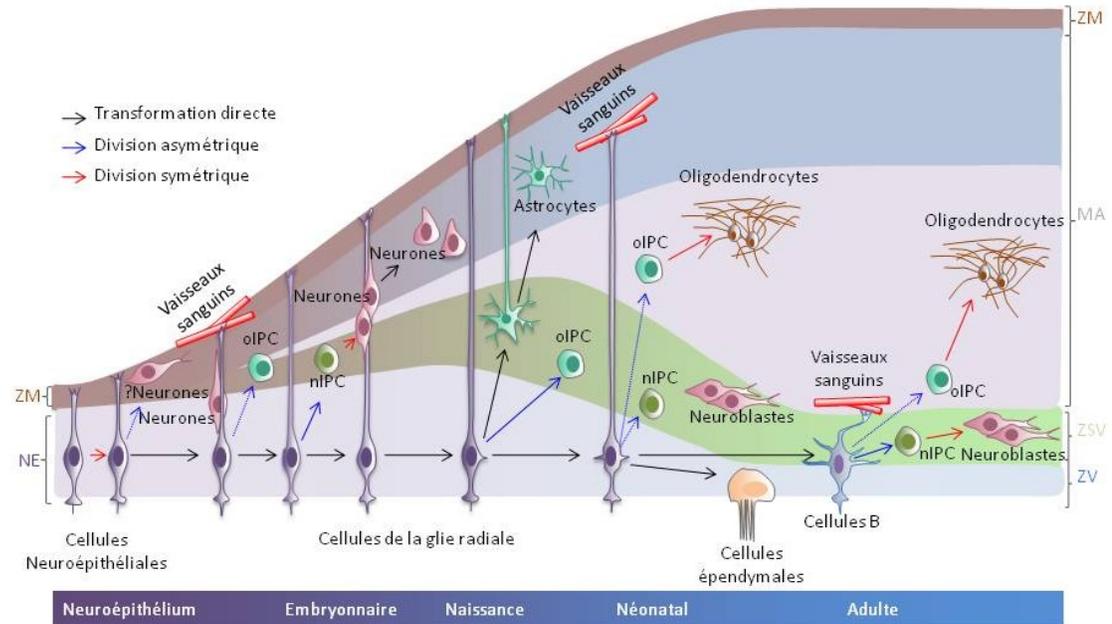


Figure 2: Représentation schématique illustrant la formation des différents types cellulaires au cours du développement du cerveau chez les mammifères.

Les flèches pleines représentent des processus démontrés expérimentalement, les flèches hachurées représentent des processus hypothétiques. MA, manteau; ZM, zone marginale; NE, neuroépithélium; ZVS, zone subventriculaire; VZ, zone ventriculaire; PIN, progéniteur intermédiaires neuronaux; PO, progéniteurs des oligodendrocytes. Adaptée de Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009³⁴.

1.2.4 Les progéniteurs basaux

Un autre type de progéniteur neural qui apparaît dans les phases précoces de la neurogenèse est constitué par les progéniteurs basaux (appelés aussi progéniteurs intermédiaires)³². Les progéniteurs basaux se détachent de la surface apicale du neuroépithélium, déplacent leur noyau dans la région basale de la zone ventriculaire (ZV) en formant la deuxième couche germinale, la zone subventriculaire (ZSV), et rétractent leurs prolongements apical et basal avant la mitose³⁵. Les divisions de ces cellules sont typiquement localisées dans la région basale de la zone ventriculaire et de la zone subventriculaire. La plupart des divisions sont symétriques, produisant deux neurones. Par contre, il y a des évidences qui suggèrent qu'une petite fraction des progéniteurs basaux chez les rongeurs peut effectuer une division symétrique proliférative, amenant à l'expansion de la population de progéniteurs basaux dans la région subventriculaire³⁶⁻³⁸.

Avant la différenciation de la glie radiale, les progéniteurs basaux constituent la source principale de neurones²⁰. Les progéniteurs basaux se différencient des cellules neuroépithéliales et de la glie radiale en ce qui concerne l'expression génique: ils n'expriment ni les marqueurs astrogliaux ni Pax6 (*paired box 6*), qui est exprimé par les cellules neuroépithéliales et par la glie radiale^{30,39-42}, alors qu'ils expriment des gènes spécifiques tels que Tbr2 (*T-box brain protein 2*)³⁹, Cux 1 et 2 (*cut-like homeobox 1 and 2*)^{43,44} et l'ARN non codant Svet1 (*subventricular expressed transcript 1*)⁴⁵.

1.2.5 La glie radiale

Après le début de la neurogenèse et l'apparition des premiers neurones, environ au jour E13 du développement embryonnaire du télencéphale murin, les cellules neuroépithéliales acquièrent les caractéristiques moléculaires et cytologiques typiques des cellules

astrogliales^{28,30,46,47}. A travers ce processus, les cellules neuroépithéliales génèrent les cellules de la glie radiale, qui ont en même temps des propriétés résiduelles neuroépithéliales et des caractéristiques astrogliales^{20,34,48}. Les cellules de la glie radiale, qui constituent des progéniteurs plus différenciés par rapport aux cellules neuroépithéliales, génèrent la plupart des neurones et les cellules gliales du cerveau^{20,40,48-50} (Figure 2). Comme les cellules neuroépithéliales, les cellules de la glie radiale expriment le filament intermédiaire nestine²⁸ et les antigènes RC1⁵¹ et RC2⁵², et présentent la localisation apicale des centrosomes⁵³ et de la prominine-1²¹, le contact avec la lamine basale⁵⁴ et la migration nucléaire intercinétique^{20,28}. Par contre, même si ces cellules maintiennent le contact avec la surface basale et la surface apicale, la migration nucléaire ne couvre pas l'entière distance entre les deux surfaces, mais est confinée à la portion de la cellule comprise entre la surface apicale et la limite basale de la zone ventriculaire³⁵.

Parmi les caractéristiques astrogliales acquises par les cellules de la glie radiale, il y a l'expression de gènes typiques des astrocytes matures (qui dérivent de la différenciation de la glie radiale⁵⁵), comme BLBP (*brain lipid-binding protein*)^{28,30,56}, RC1⁵¹, le transporteur du glutamate spécifique des astrocytes GLAST (*glutamate-aspartate transporter*)^{28,50}, la protéine liant le calcium S100β (*S100 protein β*)⁵⁷, le filament intermédiaire vimentine⁵⁸, la molécule d'adhésion TN-C (*tenascin-C*)^{59,60} l'enzyme Glutamine synthétase⁶¹ et dans certaines espèces (mais pas chez les rongeurs), la GFAP (*glial fibrillary acidic protein*)^{20,62,63} (Tableau I). De plus, des granules de glycogène commencent à s'accumuler dans le cytoplasme, une autre caractéristique des astrocytes⁶⁴. Il faut souligner qu'à part leur forme particulière, dans beaucoup d'espèces il n'y a pas de marqueurs spécifiques des cellules de la glie radiale, permettant de le distinguer des astrocytes différenciés. C'est le cas par exemple chez les primates, où les deux types cellulaires expriment GFAP⁶² (qui chez les rongeurs est exprimé seulement par les astrocytes^{20,63,65}), et l'anticorps spécifique pour la souris contre l'antigène RC2 ne fonctionne pas de façon adéquate²⁰.

Tableau I: Marqueurs moléculaires des cellules neuroépithéliales, de la glie radiale et des astrocytes matures.

Antigène/ caractéristique	Cellules neuroépithéliales	Glie radiale	Astrocytes
Nestine	+	+	-
RC2	+	+	-
RC1	+	+	+
GFAP	-	+ (absent chez les rongeurs)	+
GLAST	-	+	+
BLBP	-	+	+
TN-C	-	+	+
Granules de glycogène	-	+	+

Adapté de Malatesta et al. 2003³⁰

Pour longtemps les cellules de la glie radiale ont été considérées uniquement comme une sorte de "voie ferrée" utilisée par les neurones néo-générés, qui migrent au long de leurs prolongements radiaux de la région ventriculaire à leur destination définitive dans le cortex. Des études effectuées chez les primates montrent que pendant la neurogenèse beaucoup de jeunes neurones bipolaires sont associés avec le prolongements basal de la glie radiale⁶⁶. Des observations plus récentes^{30,33,37,50,67} ont changé cette vision, et il est maintenant clair que la glie radiale, en plus de générer les cellules gliales matures, est la source principale des neurones dans le système nerveux central.

1.2.6 La génération et la différenciation des neurones

Un petit nombre de "gènes proneuronaux", codant pour les facteurs de transcription de la famille bHLH (*basic helix-loop-helix*) a un rôle fondamental dans la génération des progéniteurs neuronaux⁶⁸. Ces protéines possèdent le domaine bHLH, un motif structural qui est responsable de leur liaison à l'ADN et de leurs propriétés de dimérisation⁶⁹. Les protéines proneuronales sont tissu-spécifiques, et lient l'ADN comme complexes hétérodimériques formés avec des protéines bHLH exprimées de façon ubiquitaire, codées par les gènes E2A, HEB et E2-2⁷⁰⁻⁷². Dans les dernières années, différentes voies moléculaires contrôlées par les gènes proneuronaux et impliquées dans la neurogenèse ont été identifiées⁶⁸. Un des rôles essentiels des protéines proneuronales est de limiter leur activité à des cellules progénitrices uniques. Les gènes proneuronaux inhibent en fait leur propre expression dans les cellules adjacentes, empêchant ainsi ces cellules de se différencier. Ce but est accompli à travers l'activation de la voie de signalisation Notch dans un processus appelé "inhibition latérale"^{68,73}, qui commence par l'induction d'un ligand de Notch, appartenant aux familles Delta ou Serrate/ Jagged (Figure 3). L'interaction entre ces ligand et les récepteurs Notch des cellules adjacentes provoque l'activation dans ces cellules de la cascade de signalisation Notch, qui induit l'expression de répresseurs Hes

(*Hairy/ Enhancer of split family*)/ Her (*human epidermal growth factor receptor 2*)/ Esr (*Estrogen receptor*), qui à leur tour répriment directement l'expression des gènes proneuronaux. Les gènes proneuronaux sont initialement exprimés dans des groupes équivalents de cellules⁶⁸: à travers l'inhibition latérale, l'expression des ces gènes est donc limitée à une cellule unique qui se différencie en neurone⁷⁴. Ce processus est réitéré, puisque l'expression de Notch est transitoire, alors que l'expression des gènes proneuronaux persiste dans le neuroectoderme tout au long de la neurogenèse: différents progéniteurs sont donc générés à différents moments et adoptent un destin cellulaire différent⁷³. Les gènes proneuronaux, en plus d'être impliqués dans la spécification des progéniteurs en neurones, inhibent également leur différenciation en cellules gliales⁷⁵.

Parmi les facteurs contrôlés négativement par la voie Notch, il y a les protéines proneuronales appartenant aux familles Mash (*mammalian achaete-scute homologue*) et Ngn (*neurogenin*)⁷⁵: leur activité consiste en la génération et délamination des progéniteurs neuronaux. Ils sont également impliqués dans l'établissement du destin neuronal aux dépens de la différenciation gliale⁷⁵. Les gènes proneuronaux promeuvent aussi la sortie du cycle cellulaire à travers l'induction des inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes^{76,77}; dans certaines lignées de progéniteurs, cette action est accomplie à travers l'activation de gènes de différenciation neuronale, comme NeuroD, qui à leur tour induisent les inhibiteurs du cycle cellulaire^{68,78}.

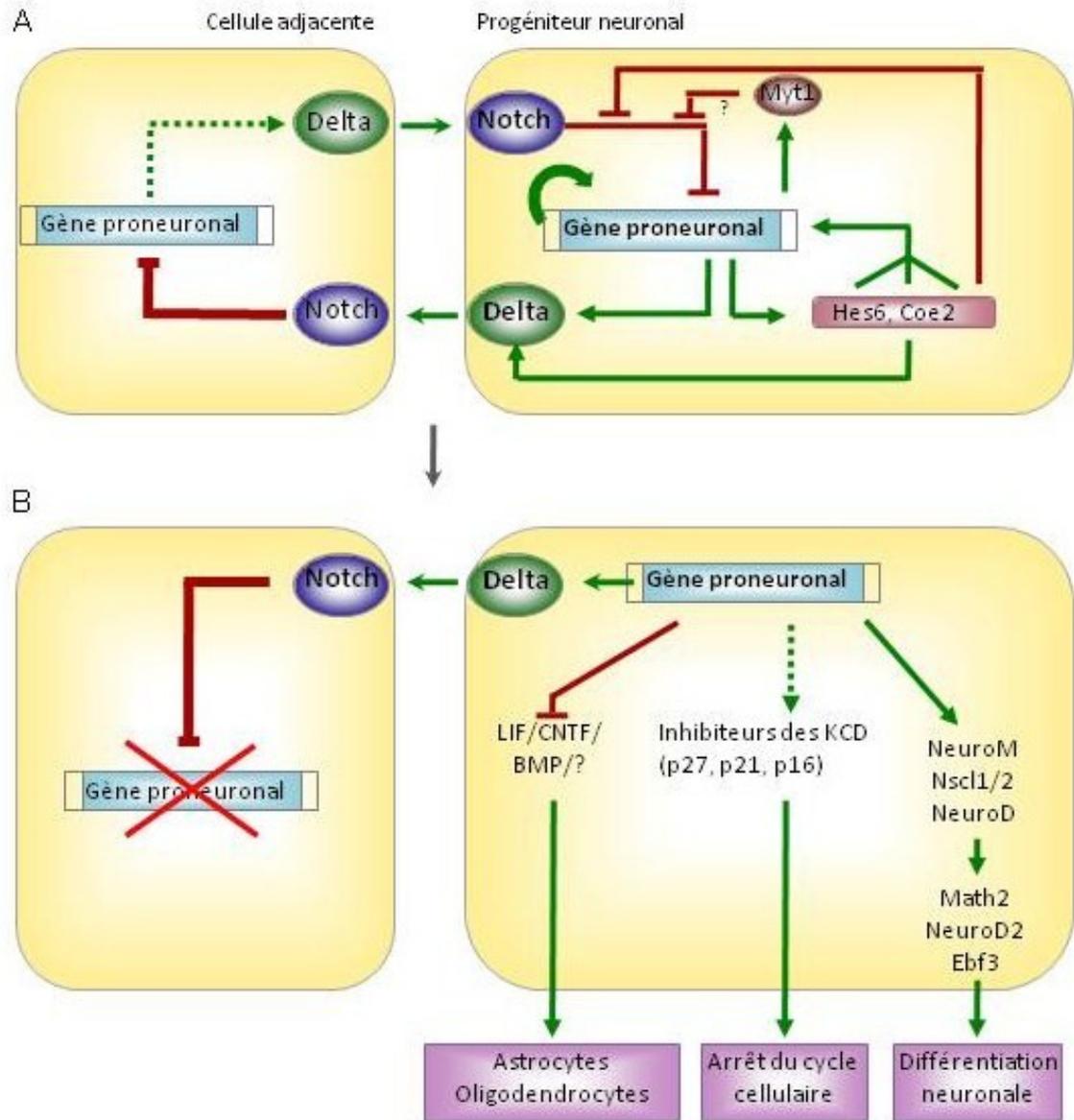


Figure 3: Schéma illustrant le processus d'inhibition latérale déclenché par la voie Notch et son rôle dans la spécification et la différenciation neuronales.

(A) Des groupes de cellules ectodermiques équivalentes expriment initialement les gènes proneuronaux et les ligands de la voie Notch (ici représentés par Delta) à un niveau similaire. À travers le processus d'inhibition latérale, une boucle régulatrice se produit entre les cellules, impliquant l'induction de la surexpression de Delta par les gènes proneuronaux

et l'inhibition de l'expression des gènes proneuronaux par la voie de signalisation Notch. Par effet de ce mécanisme, la légère augmentation de l'activité des gènes proneuronaux dans une cellule, le futur progéniteur neuronal, cause la répression de l'expression des gènes proneuronaux dans les cellules adjacentes, et l'ultérieure augmentation de l'expression des gènes proneuronaux dans la même cellules. **(B)** Les gènes proneuronaux, exprimés à haut niveau dans le progéniteur neuronal, activent un programme qui conduit à la différenciation neuronale, incluant l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation, l'inhibition des signaux gliogéniques et la promotion de la sortie du cycle cellulaire à travers l'induction de l'expression des inhibiteurs des kinases cyclines-dépendantes (KCD). Dans les cellules adjacentes, la voie Notch réprime les gènes proneuronaux, causant le blocage de la différenciation. Adaptée de Bertrand et al. 2002⁶⁸.

La voie Notch est impliquée dans la surexpression initiale des gènes proneuronaux, mais d'autres mécanismes sont nécessaires pour augmenter et maintenir les niveaux d'expression de ces gènes dans les progéniteurs neuronaux⁶⁸. Un exemple de ces mécanismes est donné par la boucle d'activation constituée par la protéine bHLH Hes6, qui est induite par les gènes proneuronaux et qui, à son tour, induit l'augmentation de ces gènes, en interférant ainsi avec l'activité inhibitrice du facteur Hes1 sur la transcription et la fonction de Mash1⁷⁹.

Les gènes proneuronaux induisent l'expression des gènes de différenciation neuronale, qui appartiennent eux aussi à la famille des facteurs bHLH^{68,80,81}. Parmi ces gènes, les membres de la famille NeuroD (*neurogenic differentiation*) sont nécessaires pour la différenciation de certaines lignées de neurones dans le cervelet et l'hippocampe⁸². Les membres de la famille Math [MATH (*meprin-associated Traf homology*) *domain-containing*] sont impliqués dans la différenciation des interneurons et des neurones du cervelet et de l'oreille interne⁸³⁻⁸⁵.

Il faut souligner que les gènes proneuronaux Mash et Ngn ont la capacité de spécifier de façon directe certains sous-types neuronaux, sans passer à travers l'activation des gènes de différenciation neuronale comme NeuroD et Math: par exemple, Mash1 est impliqué dans la spécification des neurones noradrénergiques à travers l'induction de l'expression des facteurs à homéodomaine Phox2a et Phox2b⁸⁶, et les facteurs Ngn semblent avoir un rôle dans la spécification des neurones moteurs dans la moëlle épinière en coopération avec le facteur Olig2 (*oligodendrocyte lineage transcription factor 2*)⁸⁷. Ngn2 participe à des interactions de régulation mutuelle avec des protéines à homéodomaine impliquées dans la spécification du destin neural dans la moëlle épinière ventrale⁸⁸. En effet, les protéines proneuronales et les facteurs de différenciation neuronale accomplissent souvent leurs fonctions de spécification de sous-types neuronaux à travers la régulation de protéines avec homéodomaine⁶⁸. D'autres exemples sont fournis par la spécification des neurones dans la rétine, où les facteurs NeuroD, Mash1 et Math3 nécessitent de spécifiques protéines avec homéodomaine pour spécifier les différents sous-types de neurones rétiniens^{89,90}.

1.2.7 Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales spécialisées présentes dans tout le système nerveux central qui exercent plusieurs fonctions essentielles dans des conditions physiologiques⁹¹. De plus, les astrocytes répondent aux perturbations et aux lésions du système nerveux central à travers un processus appelé astroglie réactive⁹². Au cours du développement embryonnaire du système nerveux central chez les vertébrés, les astrocytes sont générés après les neurones à partir de progéniteurs communs, à travers une interaction complexe entre statut épigénétique, facteurs de transcription et signaux environnementaux⁹¹, qui sous-tend le processus finement régulé de la différenciation séquentielle de ces différents types cellulaires.

1.2.7.1 Mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation des astrocytes dans le cortex cérébral

Le système nerveux central est principalement constitué par trois types de cellules: les neurones, et les deux types prépondérants de cellules gliales, les astrocytes et les oligodendrocytes. Chez les rongeurs, la génération des neurones commence au jour de développement embryonnaire 12 (E12), rejoint son pic au jour E14, et termine au jour E18, alors que les astrocytes sont générés à partir du jour E17, avec un sommet de production entre les premiers jours postnataux, jusqu'à la deuxième semaine de vie⁹³. Les premiers oligodendrocytes apparaissent seulement après la naissance⁹³. Les précurseurs corticaux multipotents changent donc leur comportement au cours du développement, en générant tout d'abord les neurones et par la suite la glie, par un mécanisme complexe composé du changement de compétence intrinsèque et de l'environnement externe⁹⁴.

Parmi les signaux environnementaux impliqués dans la génération des astrocytes, les cytokines de la famille IL-6 (*interleukin 6*) jouent un rôle de relief. Cette famille inclue le

facteur neurotrophique ciliaire (CNTF, *ciliary neurotrophic factor*), le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF, *leukemia inhibitory factor*) et la cardiotrophine-1 (CT-1, *cardiotrophin-1*), qui induisent l'hétérodimérisation des deux sous-unités réceptrices LIFR β (*leukemia inhibitory factor receptor subunit β*) et gp130 (*glycoprotein 130*); ces récepteurs activent différentes voies de signalisation, incluant la voie JAK-STAT (*janus kinase-signal transducers and activator of transcription*) (Figure 4). Cette voie comprend les kinases JAK, qui sont activées après association avec gp130, et les facteurs de transcription STAT qui sont phosphorylés et activés par les JAKs^{95,96}. Les STATs induisent l'activation transcriptionnelle directe des gènes astrocytaires GFAP et S100 β , à travers la liaison sur des sites spécifiques sur leurs promoteurs⁹⁷⁻⁹⁹. Cette transactivation des gènes gliales nécessite de l'interaction entre les STATs et p300/CBP (*CREB binding protein*), deux co-activateurs corrélés qui agissent en association avec plusieurs facteurs de transcription à travers différentes mécanismes, comme l'acétylation des histones¹⁰⁰. Parmi les cytokines citées ci-dessus, qui induisent l'expression des gènes gliaux dans des modèles expérimentaux, la plus pertinente est probablement CT-1, car CNTF et LIF sont utilisés comme ligands exogènes dans les modèles expérimentaux, ne sont exprimés qu'avant la naissance^{94,101,102} et leur délétion ne réduit pas (CNTF) ou réduit de façon très modeste (LIF) le nombre d'astrocytes^{94,103,104}. Par contre, CT-1, qui est exprimé par les neurones corticaux nouvellement générés, instruit les précurseurs à générer les astrocytes, et son ablation réduit amplement la gliogenèse¹⁰⁵.

Une autre famille de facteurs qui participent à l'induction de la gliogenèse, et qui agit en coopération avec la voie JAK/STAT, est la famille des BMPs (*Bone Morphogenetic Factors*) et plus particulièrement BMP2 et BMP4 (Figure 4). Ces facteurs sont exprimés dans le cerveau en développement et sont présents au jour E17, lorsque la gliogenèse commence¹⁰⁶. La liaison entre ces protéines et leurs récepteurs sérine-thréonine kinase induit l'activation des facteurs de transcription Smad (*small mothers against decapentaplegic*) 1, 5 et 8, qui s'associent au médiateur commun Smad4, et induisent l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes¹⁰⁷. Il a été démontré que BMP2 et BMP4 induisent la différenciation astrocytaire^{106,108,109}. En particulier, des études montrent que

dans les précurseurs exposés aux cytokines gliogéniques et à BMP2, Smad1 forme un complexe transcriptionnel avec STAT3 activé et p300/CBP⁹⁸, et que cela induit de façon coopérative l'activation du promoteur de GFAP.

Ces études décrivent les signaux qui instruisent positivement la gliogenèse, mais il faut illustrer aussi les mécanismes qui répriment la différenciation astrocytaire pendant la période neurogénique, et dont l'inhibition permet également la transition (le "*switch*") de la neurogenèse à la gliogenèse. L'un de ces mécanismes implique le complexe transcriptionnel formé par l'association de Smad1 et p300/CBP: pendant la phase neurogénique, le facteur bHLH Ngn1 séquestre ce complexe, en inhibant son interaction avec STAT3 et l'activation des gènes astrocytaires¹¹⁰ (Figure 5). Ngn1 empêche aussi l'activation de STAT3 par les kinases JAK¹¹⁰.

L'exposition au facteur BMP2 a donc une fonction double dépendamment de la phase de développement: pendant la neurogenèse, quand il y a un niveau élevé d'expression de Ngn1, ce dernier lie le complexe Smad1-p300/CBP en empêchant la gliogenèse (Figure 5), alors que dans la phase gliogénique, lorsque le niveau de Ngn1 baisse, le complexe Smad1-p300/CBP est libre de se lier à STAT3 et d'activer les gènes astrocytaires¹¹⁰ (Figure 4). De plus, pendant la phase gliogénique, les BMPs induisent également l'expression des facteurs inhibiteurs des bHLHs tel que les Id (*inhibitor of DNA binding*)¹¹¹, qui agissent en tant qu'antagonistes des bHLHs exprimés dans les précurseurs, en assurant ainsi que ces précurseurs se différencient en astrocytes et non en neurones.

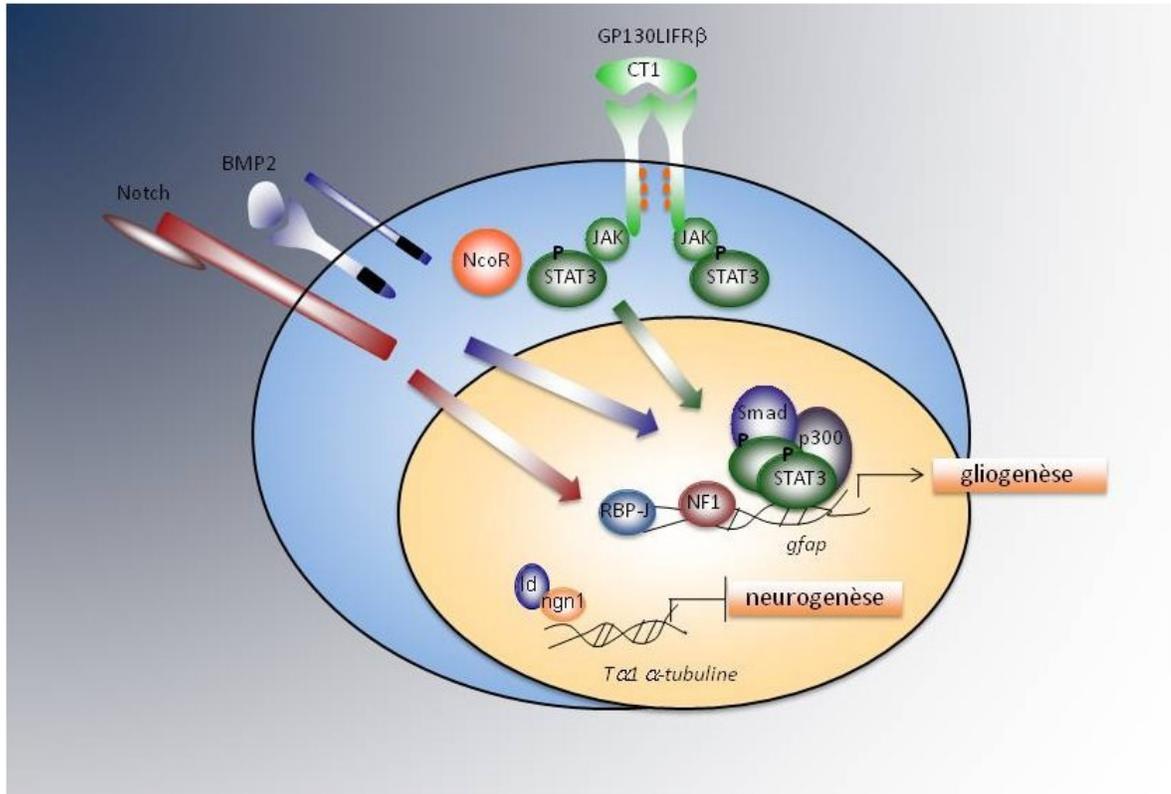


Figure 4: Représentation schématique illustrant les principaux signaux environnementaux qui convergent dans l'induction de la génération des astrocytes.

Les gènes GFAP et $T\alpha 1$ α -tubuline sont représentés comme exemples respectivement de gènes astrocytaire et neuronale. Adaptée de Miller and Gauthier, 2007⁹⁴.

Un autre mécanisme intrinsèque qui assure la répression de l'expression des gènes astrocytaires pendant la neurogenèse, consiste dans la répression épigénétique de ces gènes à travers la méthylation de l'ADN et d'autres modifications de la chromatine. En effet, le site de liaison de STAT3 dans le promoteur de GFAP est méthylé pendant la phase neurogénique, ce qui empêche l'association de STAT3 et la transcription de GFAP¹¹² (Figure 5). Un enzyme considéré responsable de cette méthylation est DNMT1 (*DNA methyltransferase 1*)^{99,113}. La DNMT1 est inactivée grâce à un mécanisme moléculaire déclenché par la voie Notch. Tel que décrit précédemment, la voie Notch est responsable du processus d'inhibition latérale qui permet la différenciation sélective de certaines précurseurs en neurones, en maintenant les cellules adjacentes dans un état indifférencié⁶⁸. Notch est aussi responsable de la maintenance de la glie radiale¹¹⁴. Il a également été démontré que Notch, dans une phase successive, induit positivement la gliogenèse, en coopération avec la voie JAK/STAT^{115,116}. Les précurseurs neuronaux Ngn+ et les jeunes neurones post-mitotiques expriment les ligands de Notch, qui lient leur récepteur sur les cellules adjacentes; l'activation de la voie Notch induit l'expression du facteur NFI (*Nuclear factor I*) A, qui lie les promoteurs de plusieurs gènes astrocytaires comme GFAP, S100 β , aquaporine4 et clusternine, en les protégeant de la liaison de la DNMT-1¹¹⁷ (Figure 4). La coopération entre Notch et la voie JAK/STAT dans la gliogenèse a également été démontrée. En effet, les facteurs de transcription RBP-J κ (*recombinant binding protein-J κ*), activés par la voie Notch, lient directement et activent le promoteur de GFAP seulement lorsque la voie JAK/STAT est activée¹¹⁵ (Figure 4). De plus, RBP-J κ induit l'activation des gènes Hes, qui inhibent les bHLHs proneuronaux¹¹⁸. Par contre, quand la voie JAK/STAT n'est pas activée, RBP-J κ lie le facteur corépresseur NCoR (*nuclear receptor corepressor*)¹¹⁶ qui réprime les gènes astrocytaires (Figure 5).

L'action répressive de NCoR est régulée par des signaux environnementaux: une étude récente a démontré que la liaison de la neoréguline (qui appartient à la famille EGF, *epidermal growth factor*) à son récepteur ErbB4 (qui homodimérise ou forme un hétérodimère avec ErbB2) détermine le clivage et le relargage du domaine intracellulaire du récepteur, qui forme un complexe avec la protéine adaptatrice TAB2 (*TGF β activated*

kinase 1/MAP3K7 binding protein 2) et avec NCoR; ce complexe se déplace dans le noyau, où il s'associe aux promoteurs de GFAP et S100 β et en empêche la transcription¹¹⁹. Une autre étude montre que l'inhibition du récepteur de la neuréguiline-1 ErbB2 cause la différenciation précoce des cellules de la glie radiale du cortex en astrocytes¹²⁰. Par conséquent, pendant la phase neurogénique, l'activation concomitante de ErbB2/ErbB4 et Notch entraîne la formation du complexe ErbB4/TAB2/NCoR/RBP-J κ qui inhibe les gènes gliogéniques⁹⁴ (Figure 5). Lorsque les précurseurs sont exposés aux cytokines gliogéniques (comme CT-1), NCoR se déplace dans le cytoplasme¹¹⁶, les STATs sont activées et RBP-J κ sont dé-réprimées, et par conséquent l'expression des gènes gliogéniques est activée⁹⁴.

Deux facteurs qui promeuvent la compétence gliogénique des précurseurs sont les facteurs de croissance EGF et FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*)⁹⁴. Il a été démontré que le récepteur de EGF (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) est exprimé asymétriquement dans les précurseurs neuronaux, et est réparti de façon différente dans les cellules filles ayant un destin cellulaire différent: il est exprimé à haut niveau dans les cellules filles qui expriment les marqueurs gliaux¹²¹; de plus, la surexpression de EGFR dans les précurseurs neuronaux augmente la production d'astrocytes, un effet qui nécessite l'activation de la voie JAK/STAT^{122,123}. EGF est un puissant facteur mitotique qui induit la mitose des astrocytes provenant de différentes régions du cerveau^{124,125}. Il a également d'autres effets sur la morphologie et la fonction des astrocytes indépendamment de son action mitogénique. Il promeut la forme étoilée des astrocytes¹²⁶, stimule l'activité de certains enzymes métaboliques présents dans les astrocytes comme la glutamine synthétase^{127,128} et promeut l'expression astrocytaire du transporteur du glutamate GLT-1¹²⁹ et de mGluR, le récepteur métabotropique du glutamate^{130,131}. FGF-2 régule la compétence des progéniteurs à se différencier en astrocytes en contrôlant leur réponse aux cytokines: FGF2 induit le remodelage de la chromatine dans le promoteur des gènes gliogéniques, en facilitant l'accès du complexe STAT-CBP au promoteur¹³².

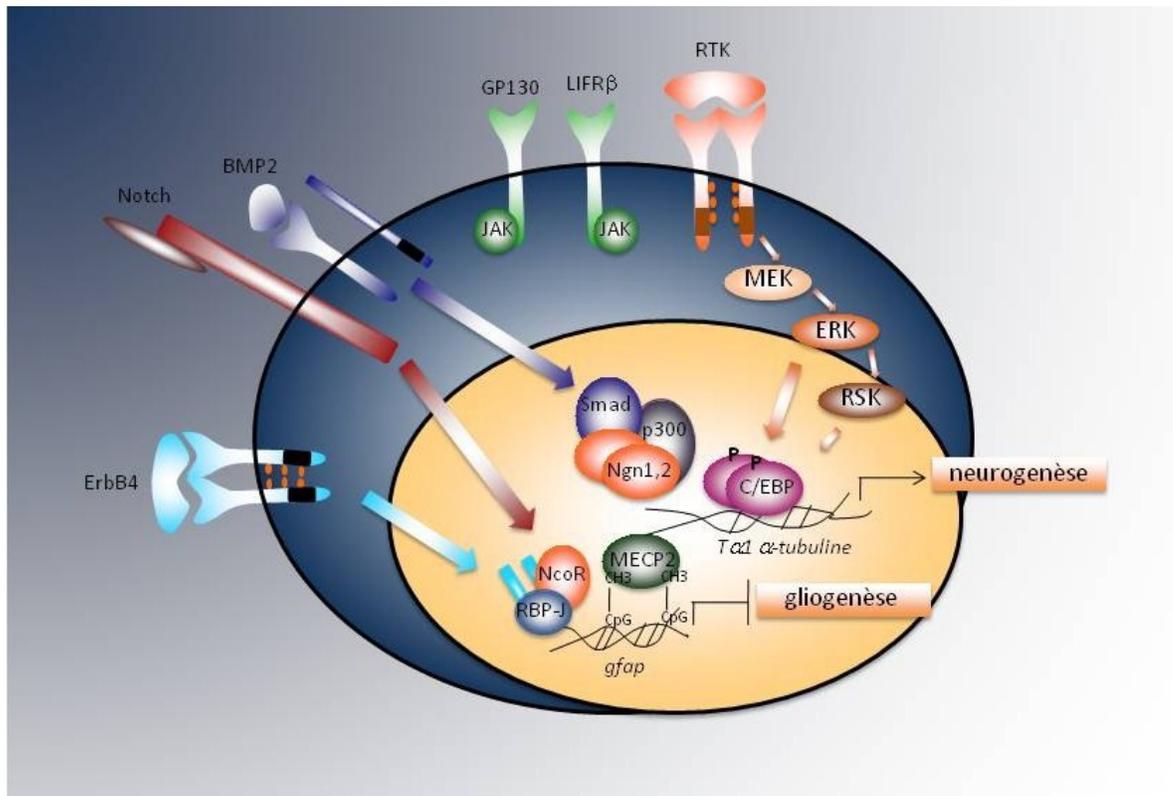


Figure 5: Représentation schématique illustrant les mécanismes intrinsèques et les signaux environnementaux qui promeuvent la neurogenèse et répriment la gliogenèse pendant la période neurogénique.

Les gènes GFAP et Tα1 α-tubuline sont représentés comme exemples respectivement de gènes astrocytaire et neuronale. Adaptée de Miller and Gauthier, 2007⁹⁴.

1.2.7.2 Physiologie et fonctions des astrocytes

Pour plusieurs décennies les astrocytes ont été considérés comme des cellules ayant un rôle purement de support, donnant un soutien structural aux neurones. Par contre, au cours des vingt-cinq dernières années, plusieurs travaux ont démontré que les astrocytes sont responsables d'une grande variété de fonctions complexes et essentielles dans le système nerveux central⁹¹.

Les astrocytes sont classifiés en deux sous-types, ayant différentes morphologies et localisations anatomiques: les astrocytes protoplasmiques, qui résident dans la matière grise, présentent plusieurs ramifications principales qui se ramifient ultérieurement en constituant un réseau dense de fins prolongements ayant une forme globale globoïde, et les astrocytes fibreux, qui se trouvent dans la matière blanche et ont plusieurs longs prolongements fibreux¹³³. Les prolongements des astrocytes protoplasmiques enveloppent les synapses et ceux des astrocytes fibreux sont en contact avec les nœuds de Ranvier; les deux types de cellules sont en contact avec les vaisseaux sanguins et forment des jonctions gap entre les prolongements distaux d'astrocytes limitrophes¹³⁴.

Même si les astrocytes ne sont générés qu'après le début de la neurogenèse, ces cellules exercent plusieurs fonctions pendant le développement de plusieurs régions de la matière grise et blanche⁹¹: ils guident la migration des axones en développement et de certains neuroblastes à travers l'expression de molécules de guidance¹³⁵, et sont essentiels pour la formations de nouvelles synapses à travers la libération de signaux moléculaires comme la thrombospondine¹³⁶.

Les astrocytes exercent des fonctions essentielles dans la maintenance de l'homéostasie du fluide interstitiel synaptique en ce qui concerne les ions, le pH et les neurotransmetteurs⁹¹: les prolongements des astrocytes sont riches en canaux pour l'eau (aquaporine-4), transporteurs pour le potassium, le bicarbonate et l'acide monocarboxylique et échangeurs H/Na, et présentent l'ATPase pompe à proton de type vacuolaire¹³⁷⁻¹³⁹. Les prolongements des astrocytes expriment également des transporteurs

pour des neurotransmetteurs comme le glutamate, l'acide γ -aminobutyrique (GABA, *γ -aminobutyric acid*) et la glycine, qui servent à capturer ces molécules dans l'espace synaptique: après leur capture, les neurotransmetteurs sont convertis par des enzymes comme la glutamine synthétase en précurseurs et recyclés aux synapses pour la conversion en transmetteurs actifs^{140,141}; les réseaux d'astrocytes connectés par les jonctions gap pourraient être capables de dissiper rapidement des petites molécules comme le potassium ou le glutamate et ainsi éviter leur accumulation potentiellement nuisible^{91,141}.

Même si les astrocytes expriment des canaux pour le potassium et le sodium qui permettent l'entrée de ces ions, ces cellules ne sont pas capables de propager les potentiels d'action le long de leurs prolongements⁹¹. Les astrocytes présentent des augmentations de calcium intracellulaire régulées, ce qui représente une forme d'excitabilité astrocytaire^{142,143}. Ces élévations de calcium, provenant de réservoirs intracellulaires, peuvent être déclenchées par des neurotransmetteurs (comme le glutamate et les purines) relâchés pendant l'activité neurale, et peuvent être propagées aux astrocytes limitrophes; elles peuvent provoquer la libération de transmetteurs par les astrocytes dans l'espace extracellulaire et avoir un rôle important dans la neurotransmission^{91,144}. Il y a plusieurs preuves expérimentales qui démontrent que les astrocytes jouent un rôle direct dans la transmission synaptique à travers la libération régulée de molécules synaptiquement actives, comme le glutamate, les purines (adénosine et ATP), le GABA et la D-sérine^{144,145}: cette libération se produit en réponse à des changements de l'activité synaptique neurale, implique l'excitabilité astrocytaire et peut altérer l'excitabilité neuronale^{91,144,145}. Ces résultats ont amené à la formulation de l'hypothèse de la "synapse tripartite" (où le prolongement astrocytaire est associé avec les éléments pré- et post-synaptiques de la synapse), qui postule que les astrocytes jouent un rôle direct et interactif avec les neurones pendant l'activité synaptique^{91,145,146}. Les astrocytes secrètent aussi des facteurs de croissance (comme le TNF α , *Tumor necrosis factor α*), les neurostéroïdes, incluant l'œstradiol et la progestérone, et, des molécules ayant des effets synaptiques, comme les récepteurs du GABA^{147,148}.

Les astrocytes rentrent en contact de manière extensive avec les vaisseaux sanguins et libèrent plusieurs médiateurs moléculaires, comme les prostaglandines, l'oxyde nitrique et l'acide arachidonique, qui peuvent moduler le diamètre des vaisseaux et le flux sanguin¹⁴⁹. Les astrocytes sont en même temps en contact avec les vaisseaux et les synapses, et pourraient être les médiateurs primaires des changements dans le flux sanguin local dans le système nerveux central en réponse à des changements dans l'activité neurale¹⁵⁰, comme cela a été récemment démontré au niveau du cortex visuel^{151,152}. Il y a des évidences qui montrent que les astrocytes ont un rôle dans la régulation de la barrière hémato-encéphalique, à travers l'induction et la régulation des propriétés des cellules endothéliales qui constituent cette structure¹⁵³.

Les astrocytes ont des rôles métaboliques importants: ces cellules possèdent des prolongements qui sont en contact avec les vaisseaux sanguins et d'autres qui sont en contact avec les neurones, ils peuvent donc capturer le glucose du flux sanguin et fournir des métabolites énergétiques aux neurones⁹¹; le glucose accumulé par les astrocytes est entreposé dans des granules de glycogène cytoplasmique, dont l'utilisation peut soutenir l'activité neuronale pendant l'hypoglycémie et les périodes d'activité neuronale élevée^{154,155}. La capture de glucose et le contenu de glycogène sont modulés par le glutamate libre au niveau des synapses¹⁵⁶.

Les astrocytes répondent à toutes les formes de dommage au système nerveux central à travers le processus de l'astrogliose, qui consiste en un ensemble de changements moléculaires, cellulaires et fonctionnels qui varient en fonction de la sévérité de la lésion. Ces changements consistent dans l'altération progressive de l'expression moléculaire, l'hypertrophie cellulaire graduelle et, dans le cas le plus sévère, la prolifération et la cicatrisation; ces modifications peuvent altérer les activités des astrocytes à travers la perte ou l'acquisition de fonctions, qui peuvent avoir des effets bénéfiques ou nuisibles pour les cellules neuronales et non neuronales adjacentes de façon contexte-spécifique^{91,92}. Plusieurs travaux ont démontré que les astrocytes sont impliqués dans différentes pathologies du système nerveux central, telles que les maladies cérébrovasculaires, les infections,

l'épilepsie, la sclérose en plaques, les troubles métaboliques et autres⁹¹. Les cancers les plus communs dans le système nerveux central, les gliomes astrocytaires, ont une nature astrogliale, et expriment le marqueur astrocytaire GFAP¹⁵⁷. Les gliomes astrocytaires malins, tels que le glioblastome (astrocytome de grade IV selon la classification de l'OMS, l'Organisation Mondiale de la Santé¹⁵⁸) sont les tumeurs intracrâniennes les plus létales; il y a actuellement une recherche intense pour identifier les cellules à l'origine des gliomes astrocytaires, et les résultats actuels suggèrent que ces cellules pourraient être des astrocytes, des précurseurs gliaux ou des cellules souches¹⁵⁷. L'hypothèse actuellement la plus soutenue est que ces cancers soient établis par une petite population de cellules souches cancéreuses cérébrales (BTSCs, *brain tumor stem cells*)¹⁵⁹, mais la nature exacte de ces cellules n'a pas encore été définie de façon irréfutable.

Les astrocytes constituent une population cellulaire hautement hétérogène; plusieurs études suggèrent que les astrocytes protoplasmiques et fibreux présentent des différences au niveau moléculaire, structurel et potentiellement au niveau fonctionnel, mais ces études ne sont encore qu'à un stade initial¹⁶⁰. Le système nerveux central contient également d'autres types cellulaires appartenant à la famille astrogliale, comme la glie de Müller dans la rétine, la glie de Bergmann dans le cervelet, les tanocytes à la base du troisième ventricule, les cribrosocytes dans le nerf optique et autres: ces cellules expriment des protéines typiques des astrocytes comme GFAP, S100 β , glutamine synthétase et autres, et exercent des fonctions similaires à celles des astrocytes de façon spécialisée selon leur localisation⁹¹. Le nombre, la complexité et la diversité des astrocytes a augmenté au cours de l'évolution: le rapport entre le nombre d'astrocytes et les neurones est de 1: 6 chez le *Caenorhabditis elegans*, de 1: 3 dans le cortex des rongeurs et de 1,4: 1 dans le cortex humain. Ces résultats démontrent que l'importance du rôle des astrocytes augmente avec la sophistication du tissu neural¹⁶¹. Le néocortex cérébral humain contient d'ailleurs plusieurs sous-types d'astrocytes, incluant des types qui ne sont pas présents dans le cortex des rongeurs¹⁶².

1.2.8 Génération des oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont des cellules gliales du système nerveux central dont la fonction principale est de soutenir les axones et de produire la gaine de myéline, qui isole les axones. La myéline est constituée de 70% de lipides et de 30% de protéines et permet la transmission efficace des potentiels d'action tout au long de l'axone¹⁶³. Les oligodendrocytes, au contraire des cellules de Schwann du système nerveux périphérique, forment des segments de gaine de myéline sur plusieurs neurones en même temps¹⁶³.

Les oligodendrocytes sont générés à partir des cellules de la glie radiale³⁴. Deux facteurs bHLH, Olig (*oligodendrocyte transcription factor*) 1 et 2, qui sont exprimés dans la moëlle épinière et le cerveau en développement, régulent positivement le développement des oligodendrocytes^{164,165}. Pendant le développement embryonnaire, ils sont produits dans différentes régions: les plus précoces sont produits à partir de précurseurs exprimant le facteur Nkx2.1 (*NK2 homeobox 1*) situés dans le télencéphale ventral, et arrivent dans le cortex aux environs du jour E16 chez la souris³⁴. Ces précurseurs se forment dans la zone ventriculaire de l'éminence ganglionnaire médiale (EMG)¹⁶⁶. Une sous-population d'oligodendrocytes qui migrent vers le cortex et l'hippocampe est produite à partir de progéniteurs qui génèrent également les neurones GABAergiques^{34,167}. Dans le télencéphale ventral les facteurs à homéodomaine Dlx (*distal-less homeobox*) 1 et 2, qui sont requis pour la production des neurones GABAergiques, inhibent la formation des oligodendrocytes Olig2-dépendante, ainsi modulant le destin cellulaire des précurseurs multipotents¹⁶⁸.

Des vagues secondaires d'oligodendrocytes sont générées plus dorsalement par des précurseurs exprimant Gsh2 (*glutathione synthetase 2*) dans l'éminence ganglionnaire latérale et/ou caudale, qui produisent les oligodendrocytes qui migrent dans le cortex dorsal¹⁶⁹. A partir du jour E18 des oligodendrocytes sont produits à partir de précurseurs exprimant Emx1 (*empty spiracles homeobox-1*) présents dans le cortex dorsal¹⁶⁹. La plupart des oligodendrocytes générés de manière précoce disparaît après la naissance et les cellules

présentes après la naissance dérivent principalement des précurseurs exprimant Emx1¹⁶⁹. Les précurseurs génèrent des progéniteurs des oligodendrocytes positifs pour le protéoglycane à chondroïtine sulfate NG2 (*nerve/glial antigene 2*), distribués à travers le cerveau, qui prolifèrent en réponse à des signaux locaux qui ne sont pas encore connus^{34,170}. Les oligodendrocytes sont produits aussi chez l'adulte, par les cellules souches neurales adultes de type B de la zone subventriculaire (décrite ci-dessous)¹⁷¹.

1.2.9 Les cellules souches neurales adultes

Les cellules souches neurales ne sont pas seulement présentes pendant le développement embryonnaire, mais demeurent également dans certaines régions du cerveau adulte, où elles produisent des cellules gliales et des neurones^{172,173}. Les premières démonstrations que la neurogenèse se produit dans le cerveau adulte de mammifère ont été obtenues par des expériences de marquage du cerveau de rat avec de la [³H]-thymidine, effectuées par Altman et Das en 1965¹⁷⁴. Au cours des vingt dernières années, les progrès techniques, et plus particulièrement les nouvelles méthodes pour marquer les cellules en division, comme les vecteurs rétroviraux et la bromodeoxyuridine (BrdU), ont permis de démontrer que des nouveaux neurones sont générés continuellement dans le cerveau adulte¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Les cellules souches neurales adultes, définies comme des progéniteurs multipotents et capables de s'auto-renouveler, résident dans deux régions germinales du cerveau adulte des mammifères (Figure 6): la zone subventriculaire (ZSV) qui borde les ventricules latéraux^{176,178,179} et la zone subgranulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe^{180,181}.

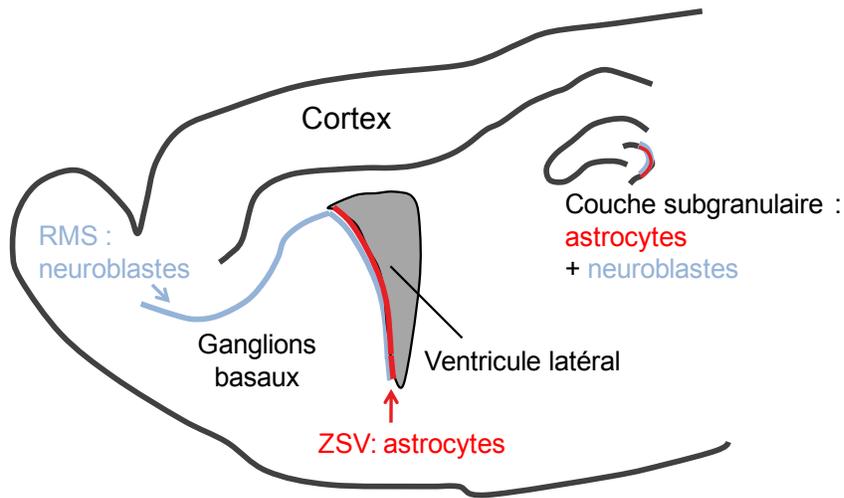


Figure 6: Les sièges des cellules souches neurales adultes : la ZSV et la ZSG.

(A) Représentation schématique d'une section sagittale du prosencéphale de rongeur. Les astrocytes de la zone subventriculaire (ZSV) des ganglions basaux et de la ZSG (zone subgranulaire) du gyrus denté de l'hippocampe sont représentés en rouge, et sont les précurseurs des neuroblastes, représentés en bleu. CMR, courant de migration rostrale; ZSV, zone subventriculaire; ZSG, zone subgranulaire. Adaptée de Götz, 2003¹⁸².

1.2.9.1 Cellules souches neurales de la zone subventriculaire adulte

La ZSV présente la plus grande concentration de cellules en division du cerveau adulte^{179,183}. La composition cellulaire de cette région a été décrite grâce à des analyses immunohistochimiques et de microscopie électronique^{178,184-186} (Figure 7).

La ZSV contient des cellules souches neurales de nature astrocytaire qui se divisent lentement, appelées "cellules de type B". Ces cellules produisent les "cellules de type C", constituant la population transitoire en prolifération active, qui à leur tour se différencient en neuroblastes immatures, ou "cellules de type A"⁴⁸. Les neuroblastes migrent via des chaînes orientées tangentiellement enveloppées par des tubes gliaux constitués d'astrocytes: ces chaînes se condensent dans la ZSV antérieure et forment le courant de migration rostrale (CMR), qu'ils parcourent pour atteindre le bulbe olfactif, où ils se différencient en interneurones^{187,188} (Figure 6). Des études récentes montrent que les progéniteurs de la ZSV produisent aussi des oligodendrocytes¹⁷¹. La surface ventriculaire adjacente à la ZSV est tapissée de cellules épendymaires ciliées. Les cellules de type B sont en contact avec le ventricule à travers un prolongement qui s'intercale entre les cellules épendymaires: ce prolongement inclut un court cil primaire qui s'étend dans le ventricule^{184,185}. Les cellules de la ZSV sont également en contact avec les autres éléments de la ZSV: vaisseaux sanguins, microglie et matrice extracellulaire¹⁸⁹.

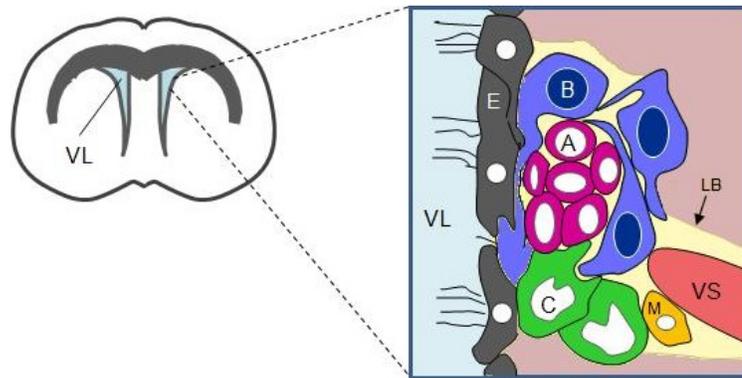


Figure 7: Architecture de la ZSV.

Représentation schématique d'une section coronale de cerveau de souris illustrant l'architecture de la ZSV: VL, ventricule latéral; LB, lame basale, VS, vaisseau sanguin, B, cellules de type B (astrocytes de la ZSV); C, cellules de type C; A, cellules de type A (neuroblastes); M, microglie; E, cellule épendymaire. Adaptée de Ihrie et Alvarez-Buylla, 2008⁴⁸.

En dépit de leurs propriétés de cellules souches, les cellules de type B présentent des caractéristiques ultra-structurales et des marqueurs des cellules astrogliales, comme l'expression de GFAP et de GLAST, faisceaux de filaments intermédiaires, prolongements qui s'intercalent entre les autres cellules et complexes de jonctions gap^{178,190,191}. Ces cellules sont donc souvent définies "astrocytes de la ZSV", distincts des astrocytes du parenchyme cérébrale, et, différemment des astrocytes parenchymateux matures, elles expriment les marqueurs de cellules souches embryonnaires nestine, CD133, Sox2 (*sex determining region Y-box 2*) et LeX (*Lewis antigen X*)^{192,193}; ces cellules sont négatives pour les marqueurs des cellules différenciées CD24, O4, NeuN (*neuronal nuclei*) et S100β. Les cellules de type A sont Dlx2 (*distal-less homeobox 2*)⁺Mash⁺ et les neuroblastes expriment les marqueurs PSA-NCAM (*polysialic acid-neural cell adhesion molecule*) et DCX (*doublecortin*)¹⁹². Actuellement il n'y a pas un marqueur moléculaire spécifique permettant d'identifier les cellules souches de la zone subventriculaire adulte. Un candidat prometteur est le récepteur nucléaire orphelin Tlx (*tailless*), qui est exprimé par ces cellules et semble avoir un rôle essentiel dans leur génération et maintenance et dans la neurogenèse adulte¹⁹⁴. Comme les cellules souches neurales embryonnaires, les cellules souches adultes de la ZSV peuvent, dans des conditions appropriées de culture, former des colonies capables de s'auto-renouveler (neurosphères)¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Ces cellules, après l'enlèvement des facteurs de croissance, forment des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes, suggérant qu'elles sont aussi multipotentes¹⁹⁵. L'habilité des astrocytes de la ZSV à se comporter comme des cellules souches *in vitro* a été démontrée expérimentalement^{184,185}. L'essai des neurosphères a été extensivement utilisé pour indiquer la présence de cellules souches dans des tissus ou en culture, même si des études récentes suggèrent que cet essai pourrait ne pas refléter avec précision l'existence de cellules souches dans la ZSV: il a été démontré que la capacité à former des neurosphères n'est pas limitée aux progéniteurs primaires (cellules B), puisque même les cellules de type C de la ZSV peuvent en générer suite à l'exposition à EGF¹⁸⁶: sous l'influence de ce facteur, les cellules de type C sont responsables de la production de la plus grande partie des neurosphères. En effet, les récepteurs de plusieurs facteurs de croissance sont exprimés par

des types cellulaires différents dans la ZSV. Les récepteurs pour le facteur de croissance des fibroblastes (FGF, *fibroblast growth factor*) et pour le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, *platelet-derived growth factor*) sont exprimés par les cellules de type B, alors que le récepteur de EGF est principalement exprimé par les cellules de type C^{186,198,199}. Cela suggère donc que l'essai des neurosphères pourrait donner une mesure imparfaite du potentiel des cellules souches *in vivo*²⁰⁰.

Les cellules de type B de la ZSV partagent plusieurs caractéristiques avec les cellules de la glie radiale: certaines cellules B maintiennent un long prolongement qui ressemble à celui des cellules de la glie radiale⁴⁸. Comme la glie radiale, les astrocytes de la ZSV ont également une polarité apico-basale et rentrent en contact avec le lumen du ventricule à travers un court prolongement qui s'intercale dans la couche épendymale²⁰¹ (Figure 7). Ces deux types cellulaires partagent également plusieurs marqueurs moléculaires. Des résultats expérimentaux obtenus en marquant spécifiquement les cellules de la glie radiale néonatale à l'aide d'une stratégie basée sur le système Cre-loxP ont montré que ces cellules génèrent plusieurs types cellulaires, y compris les astrocytes de la ZSV adulte²⁰². Ces résultats suggèrent que les cellules souches neurales adultes font partie d'une lignée évolutive qui commence avec les cellules neuro-épithéliales, qui continue avec la glie radiale et qui se poursuit avec les astrocytes de la région germinale adulte^{48,203} (Figure 2).

Certains travaux ont suggéré que les cellules épendymaires qui bordent la surface du ventricule pourraient avoir un rôle de cellules souches adultes^{204,205}. Par contre, d'autres études montrent que les cellules épendymaires ne génèrent pas de neurosphères *in vitro*^{193,206} et que ces cellules, qui dérivent de la différenciation de la glie radiale, se différencient et deviennent post-mitotiques au cours du développement²⁰⁷. Une explication possible du fait que des cellules dans la couche épendymaire produisent des nouveaux neurones pourrait être la présence des astrocytes de la ZSV intercalés entre les cellules épendymaires¹⁹². Il y a tout de même la possibilité que, dans certaines conditions spécifiques telles que lésion ou culture cellulaire, les cellules épendymaires ou leurs progéniteurs soient capables de se diviser et deviennent neurogéniques¹⁹². Cependant, des

expériences de traçage de lignées avec des marqueurs spécifiques seront nécessaires pour évaluer cette hypothèse¹⁹².

1.2.9.2 Cellules souches neurales de la zone subgranulaire du gyrus denté de l'hippocampe adulte

L'autre région qui produit des nouveaux neurones à l'âge adulte dans le cerveau des mammifères est le gyrus denté de l'hippocampe^{174,208-210} (Figure 8). Les nouveaux neurones produits par les cellules souches du gyrus denté semblent être impliqués dans l'apprentissage et la mémoire^{211,212}. Ces neurones naissent dans la région subgranulaire, qui est située à l'interface de la couche des cellules granulaires et de l'hile. Les progéniteurs primaires de la ZSG ont des propriétés astrocytaires et sont en strict contact avec leur descendance²¹³: ils ont un prolongement radial proéminent et un court prolongement orienté tangentiellement à la base de la ZSG. Ces astrocytes radiaux sont appelés "progéniteurs de type I". La ZSG contient également des astrocytes orientés horizontalement qui n'ont pas de prolongements radiaux^{213,214}. Cependant, leur rôles de progéniteurs pour d'autres cellules n'a pas encore été clarifié. La progéniture immature des astrocytes radiaux, appelée "cellules de type II" ou "cellules de type D"^{191,210,214,215} forme des grappes serrées qui se nichent entre les prolongements des astrocytes radiaux. Ces cellules migrent sur une courte distance dans la couche de cellules granulaires et forment des nouveaux neurones granulaires^{213,214,216}.

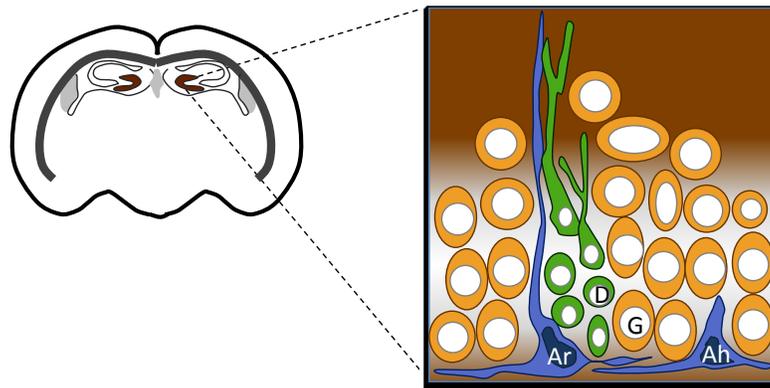


Figure 8: Architecture de la ZSG.

Représentation schématique d'une section coronale de cerveau de souris illustrant l'architecture de la ZSG. Ar, astrocytes radiaux (progéniteurs de type I); Ah, astrocytes horizontaux; D, cellules de type D (précurseurs immatures ou progéniteurs de type II); G, neurones granulaires matures. Adaptée de Ihrie et Alvarez-Buylla, 2008⁴⁸.

Contrairement aux autres astrocytes de la ZSG, qui expriment seulement GFAP, les progéniteurs de type I expriment GFAP et nestine. Les cellules de type D (D2-D4) présentent des propriétés de neurones à différents stades de développement, et sont caractérisées par l'expression de *Dcx* (*doublecortin*), PSA-NCAM, TOAD64 (*turned on after division, 64 kDa*), NeuroD, Prox1 (*prospero-related homeobox 1*) et NeuN^{177,213,215}. L'origine des astrocytes de la ZSG qui fonctionnent comme cellules souches dans le cerveau adulte n'a pas encore été démontré expérimentalement. Par contre, des travaux des années 1980 suggèrent, alors que les propriétés de cellules souches de ces astrocytes n'avaient pas encore reconnues, que les astrocytes radiaux du gyrus denté de l'hippocampe dérivent de la glie radiale résidant dans la partie de la zone ventriculaire qui contribue à la formation de l'hippocampe²¹⁷. Plus récemment une connexion évolutive entre la glie radiale et ces astrocytes a été proposée²¹³.

La neurogenèse dans le gyrus denté de l'hippocampe est régulée par de multiples signaux physiologiques et environnementaux incluant les corticostéroïdes^{218,219}, l'activation du récepteur du glutamate²²⁰, l'exercice²²¹ et les antidépresseurs²²². Il est possible que les longs prolongements radiaux des astrocytes jouent un rôle fondamental dans la captation des signaux et des changements du niveau d'activité neuronale dans le gyrus denté induits par ces conditions, ce qui pourrait alors influencer la prolifération et la différenciation des astrocytes et des cellules de type D adjacentes³⁴.

1.2.9.3 La niche des cellules souches neurales adultes: régulation de la neurogenèse dans le cerveau adulte

La "niche" est définie comme le microenvironnement qui soutient et régule le comportement des cellules souches, incluant leur maintien, leur auto-renouvellement, leur différenciation et leur développement^{223,224}. Dans la ZSV, la niche s'étend du ventricule latéral au courant de migration rostral, jusqu'au bulbe olfactif¹⁸⁷, alors que, dans la ZSG, la

niche est moins évidente structurellement et est confinée à la ZSG de l'hile²¹³. L'astroglie, les cellules épendymaires, les cellules vasculaires, les précurseurs immatures descendant des cellules souches neurales adultes et les neurones matures constituent les composants principaux de la niche²²³. Les deux régions germinales contiennent également des vaisseaux sanguins^{189,225}, suggérant que des facteurs provenant de la vascularisation pourraient réguler les cellules souches et leur descendance. De nombreux facteurs extrinsèques dans la niche ont des effets significatifs sur la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches neurales adultes¹⁷² et beaucoup de voies de signalisation moléculaire régulant la prolifération et la différenciation sont actives dans les cellules de la ZSV et de la ZSG⁴⁸. Plusieurs ligands mitogéniques ou morphogéniques régulent les cellules souches de la niche et leur descendance. Les facteurs EGF et FGF2, utilisés pour l'isolation et l'expansion des cellules souches neurales adultes *in vitro*, semblent avoir des effets différents *in vivo*^{226,227}. L'infusion d'EGF dans les ventricules induit la prolifération et la production d'astrocytes dans la ZSV, alors que l'infusion de FGF2 induit l'expansion des neuroblastes et l'augmentation de la neurogenèse. L'infusion de PDGF induit un effet semblable à celui de EGF, c'est-à-dire l'activation des astrocytes et la gliogenèse à dépit de la neurogenèse¹⁹⁸.

Les facteurs BMP augmentent eux aussi la formation d'astrocytes en dépit de la neurogenèse, alors que Noggin, un antagoniste soluble des BMPs exprimé par les cellules épendymaires de la ZSV adulte, promeut la neurogenèse²²⁸. La neurigenesine 1, un facteur sécrété par les astrocytes, peut promouvoir la neurogenèse à travers l'inhibition de la voie BMP²²⁹. Les cytokines de la famille IL-6 activent le signal de STAT médié par gp130 et agissent en synergie avec la voie BMP dans la production des astrocytes *in vitro*, et il y a des suggestions que SMAD et STAT forment un complexe avec gp 130^{97,98}; la surexpression de LIF dans le cerveau adulte promeut l'auto-renouvellement des cellules souches et inhibe la neurogenèse²³⁰.

La voie Shh joue un rôle dans le maintien des cellules souches neurales adultes et est active dans les cellules de type B, dans les cellules C et dans les neuroblastes²³¹; les cils primaires des astrocytes de la ZSV semblent jouer un rôle important dans la signalisation

Shh²³¹. Il a été en effet démontré que des composants des récepteurs de cette voie s'accumulent aux niveaux des cils primaires²³².

Des études montrent que le facteur VEGF (*vascular endothelial growth factor*), produit dans le cerveau par les cellules endothéliales du plexus choroïde, semble être un facteur trophique de survie pour les cellules souches neurales adultes²³³; le facteur PEDF (*pigment epithelium-derived factor*), secrété par les cellules épendymaires et endothéliales de la ZSV, promeut spécifiquement l'auto-renouvellement des cellules souches sans en affecter la prolifération²³⁴. La prolifération et la différenciation des cellules souches neurales adultes sont contrôlées par plusieurs autres facteurs, comme les neurotransmetteurs GABA²³⁵ et dopamine²³⁶, la voie Wnt²³⁷ et les composants de la matrice extracellulaire, dont on suppose un rôle dans le contrôle de la présentation des facteurs mitogènes aux cellules souches²³⁸.

2 Pax6: un facteur de transcription conservé impliqué dans le développement

2.1 Les gènes Pax

La famille des gènes Pax (*paired-box*) comprend neuf facteurs de transcription impliqués dans le développement²³⁹. La caractéristique commune de cette famille est la présence du *paired-box*, une séquence d'ADN de 384 paires de base codant pour le domaine *paired*, un domaine de liaison à l'ADN de 128 acides aminés qui a été originalement identifié dans les gènes de segmentation *paired*, *gooseberry* et *gooseberry neuro* de la *Drosophile*^{240,241} et successivement dans deux autres gènes de *Drosophile* et dans des gènes d'autres organismes tels que la souris, les nématodes, l'oursin et les humains²⁴²⁻²⁴⁴. La famille, comprenant neuf membres chez la souris (Pax1-9) et chez

l'humain (PAX1-9), est subdivisée en quatre sous-groupes sur la base de la présence ou de l'absence d'un octa-peptide conservé (domaine OP) et de la présence, absence ou troncation d'un homéodomaine²⁴⁵.

Les gènes Pax sont des régulateurs du développement tissulaire et de la différenciation cellulaire chez l'embryon, et agissent en promulguant la prolifération cellulaire, la spécification de la destinée cellulaire, la migration et la survie²⁴⁵. L'expression des gènes Pax est principalement observée pendant le développement embryonnaire, et, dans la plupart des cas, leur expression s'atténue une fois que le développement est complété; par contre, dans certains tissus, l'expression des gènes Pax persiste chez l'adulte, où ils peuvent être réexprimés²⁴⁵. Les fonctions dans les tissus adultes incluent la direction d'événements régénératifs organo-spécifiques et la protection contre la mort cellulaire induite par le stress²⁴⁵⁻²⁴⁷. Des mutations spécifiques des gènes Pax causent plusieurs anomalies du développement chez la Drosophile, la souris et l'humain^{239,245,248}. Certains membres de la famille Pax, particulièrement des sous-groupes II (Pax2,5 et 8) et III (Pax3 et 7) jouent des rôles importants au niveau des néoplasies humaines, telles que les cancers rénaux, les lymphomes, le carcinome médullaire de la thyroïde, le rhabdomyosarcome et le mélanome²⁴⁸.

2.2 Pax6: structure et isoformes

Pax6 est un membre de la famille Pax (sous-groupe IV) qui a été isolé chez plusieurs espèces²⁴⁵. Pax6 a été isolé pour la première fois chez l'humain, la souris et le poisson zébré²⁴⁹⁻²⁵¹, et ensuite chez d'autres vertébrées et invertébrés, incluant la Drosophile^{239,252}. Tous les gènes Pax6 isolés jusqu'à présent codent pour des protéines contenant un domaine *paired* N-terminal de 128 acides aminés, une région *linker* de longueur variable, un homéodomaine de 60 acides aminés et une région C-terminale riche en proline, sérine et thréonine (PST)²³⁹ (Figure 9). L'octa-peptide contenu dans plusieurs protéines Pax n'est

pas présent dans Pax6. Le gène Pax6 de souris (situé sur le chromosome 3) et d'humain (situé dans la position chromosomique 11p13) codent pour deux protéines identiques de 422 acides aminés. La longueur des autres protéines Pax6 chez les vertébrés varie entre 416 (caille) et 437 (poisson zébré) acides aminés. Comparée avec la protéine de souris, l'identité globale de séquence des protéines des autres espèces est comprise entre 97% (chez le poisson zébré) et plus de 99% chez la caille atteignant 100% chez le rat et le poulet. Les protéines Pax6 des invertébrées ont des régions *linker* et C-terminales qui varient considérablement en longueur et sont généralement plus longues que celles des vertébrés²³⁹.

Les deux domaines de liaison à l'ADN, le domaine *paired* et l'homéodomaine présentent un haut niveau de conservation de séquence: chez les vertébrés, ces domaines sont identiques et l'homologie de séquence entre la protéine de la souris et celle des invertébrés est dans la plupart des cas supérieur au 90%²³⁹. La comparaison de la séquence de Pax6 avec celle des autres protéines Pax a permis d'identifier huit acides aminés spécifiques pour Pax6 (dont l'asparagine 47, un important déterminant pour la spécificité de liaison à l'ADN, est partagé avec le seul Pax4) présents dans la plupart des organismes^{239,253}. Des similarités additionnelles ont été observées au niveau des séquences N- et C-terminales flanquant l'homéodomaine, et dans le peptide *linker*. La région PST C-terminale, ayant un rôle de transactivation, présente une haute variabilité de séquence et de longueur. Toutefois, certaines homologies de séquence ont été trouvées chez les vertébrés, l'oursin et le calmar²³⁹.

Le gène Pax6 produit différentes isoformes de la protéine, dont les plus communes, Pax6 et Pax6(5a) sont générées par épissage alternatif de l'exon 5a^{251,254} (Figure 9). L'insertion de l'exon 5a dans le transcrit cause l'insertion d'un segment de 14 acides aminés dans le domaine *paired* de la protéine, qui affecte ses propriétés de liaison à l'ADN et de transactivation²⁵⁴⁻²⁵⁶. Des preuves expérimentales suggèrent que les deux protéines ont deux fonctions différentes: par exemple, le niveau d'expression différent des deux isoformes dans l'œil et dans le cerveau de la souris, et l'occurrence d'un phénotype oculaire

humain causé par la surexpression aberrante de la forme étendue^{257,258}. Le locus Pax6 code également pour une isoforme produite à partir d'un promoteur alternatif situé entre les exons 4 et 5 et un codon alternatif de début de la traduction dans l'exon 7^{259,260}. Cette isoforme, appelée Pax6(Δ PD), n'a pas de domaine *paired*; la surexpression de Pax6(Δ PD) cause une sévère microphtalmie due à l'apoptose des cellules de la lentille pendant le développement embryonnaire^{260,261}. Concernant l'expression du locus Pax6, au moins six régions *enhancer* et trois promoteurs (P0, P1 et P α) ont été identifiés²⁶²⁻²⁶⁴. La forme canonique de Pax6 et Pax6(5a) sont produites à partir des deux promoteurs P0 et P1, alors que le transcrit produit à partir de P α codes pour Pax6(Δ PD)^{259,260,265}. Plusieurs régions régulatrices en *cis* contenant des sites de liaison pour des facteurs de transcription ont été identifiées dans la séquence de Pax6 et sont responsables de son expression tissu-spécifique²⁵⁹. Pax6 est un facteur de transcription ayant des multiples fonctions dans le développement de plusieurs organes, et cette complexité est déterminée probablement par l'utilisation des différentes formes d'épissage alternatif, l'expression tissu-spécifique et les interactions avec plusieurs autres protéines^{255,259}.

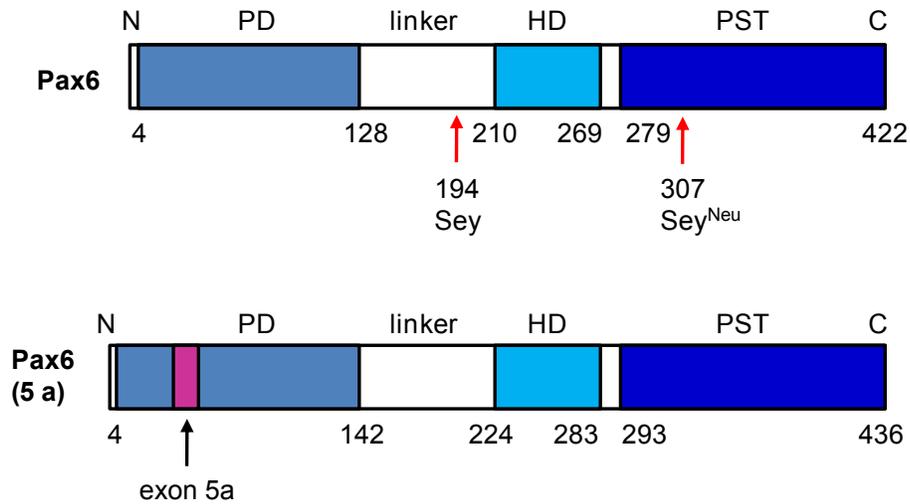


Figure 9: Structure de Pax6.

La protéine Pax6 est constituée par des domaines distincts: un domaine *paired* en position N-terminale (PD), une région *linker* riche en glycine (Gln/Gly), un homéodomaine (HD) et un domaine de transactivation C-terminal riche en proline, sérine et thréonine (PST). La figure montre les deux isoformes les plus communes de la protéine, Pax6 et Pax6 (5a), générées par l'épissage alternatif de l'exon 5a. L'insertion de l'exon 5a dans le transcrit cause l'insertion d'un segment de 14 acides aminés dans le domaine *paired* de la protéine. Les flèches rouges indiquent les deux mutations les plus étudiées chez la souris, les mutations ponctuelles Sey (*small eyes*) et Sey^{Neu} (*small eyes, Neuherberg*), qui codent pour deux codons de terminaison prématurés et causent la production d'une protéine tronquée. Adaptée de Simpson et Price, 2002²⁵⁵.

2.3 Pax6: expression et fonctions

Chez la souris, Pax6 est exprimé à partir du huitième jour de développement embryonnaire (E8) au stade où les premiers somites sont formés et les plis neuraux commencent à se fermer dans la région cervicale. Au début, il est exprimé dans une vaste portion du neuroépithélium du prosencéphale présomptif (incluant les régions qui formeront les vésicules optiques, le télencéphale et le diencephale) et du rhombencéphale, de la moëlle épinière en développement, et dans une vaste région de l'ectoderme de surface de la tête recouvrant le prosencéphale²³⁹. Au cours du développement, l'expression de Pax6 est régulée et restreinte à des régions spécifiques du cerveau, du cervelet, de la moëlle épinière, des parties neurales des yeux et du nez (les vésicules optiques et le bulbe olfactif) et aux régions dérivées de l'ectoderme de surface, telles que les placodes de l'œil (qui se développent en lentille et cornée) et les placodes du nez (qui se développent en épithélium olfactif). Il est également exprimé au niveau des composantes endocrines du pancréas, de l'intestin et de la glande pituitaire²⁶⁶⁻²⁶⁸.

Les mutations de Pax6 sont semi-dominantes et, à l'état hétérozygote, provoquent le phénotype *small eye* (caractérisé par la réduction de la taille de l'œil) chez la souris et *Aniridia* chez l'humain^{250,269}. Les mutations les plus étudiées chez la souris sont les mutations punctiformes Sey (*small eyes*) et Sey^{Neu} (*small eyes, Neuherberg*), qui causent la production d'une protéine tronquée²⁶⁹ (Figure 9). L'*Aniridia* est caractérisée par l'hypoplasie de l'iris, la présence de cataracte et de glaucome ainsi que la diminution progressive de la vision²⁵⁰. Les souris mutantes homozygotes meurent après la naissance, elles n'ont pas d'œil ni de nez et ont un cerveau gravement malformé^{270,271}. Le phénotype de la mutation homozygote chez l'humain est similaire au phénotype chez la souris²⁷². Chez la Drosophile, les mutations dans l'homologue de Pax6 ey (*eyeless*) causent des défauts analogues à ceux trouvés chez la souris et l'homme²⁵². La surexpression de Pax6 dans les embryons de Drosophile ou de Xenopus cause la formation d'œil ectopique^{273,274}. Tous ces résultats supportent l'hypothèse que Pax6 opère comme le gène maître régulateur dans le

développement de l'œil²⁷⁵. En plus de ses fonctions centrales dans le développement de l'œil, Pax6 joue plusieurs rôles dans la régionalisation et dans la maturation d'autres structures du système nerveux central, incluant le cerveau, le cervelet et la moëlle épinière²³⁹. Il est également impliqué dans le développement du système olfactif²⁷⁶. Pax6 agit au niveau de l'expression génétique, du développement et de la production hormonale du pancréas^{277,278}, dans la production de proglucagone par les cellules endocrines de l'intestin²⁶⁷ et dans le développement et la production hormonale de la glande pituitaire²⁶⁶.

Pax6 agit dans un vaste spectre de tissus et régule différents processus cellulaires, par le contrôle de l'expression de plusieurs molécules, comprenant d'autres facteurs de transcription, des molécules d'adhésion et de signalisation intercellulaire, des hormones et des protéines structurales²⁵⁵. Au cours du développement, il est exprimé dans différents tissus de l'organisme et exerce plusieurs fonctions tissu-spécifiques; la complexité de la fonction de Pax6 peut être expliquée par les propriétés de cette protéine. Son activité est régulée à travers son domaine de transactivation (domaine PST)²⁷⁹ et les éléments en *cis* présents dans sa séquence permettent la liaison de facteurs de transcription régulateurs²⁵⁹. De plus, comme illustré précédemment, dans l'organisme on retrouve différentes isoformes de Pax6, ce qui augmente la complexité de ses effets; par exemple, il y a des études décrivant une interaction due à la formation d'un complexe entre l'isoforme de Pax6 canonique et celle qui n'a pas de domaine *paired*²⁸⁰. Cette interaction provoque l'augmentation de l'activation transcriptionnelle de la forme canonique de Pax6, impliquant que les interactions entre les différentes isoformes de Pax6 pourraient être critiques pour la régulation de sa fonction^{255,280}. Pax6 exerce ses fonctions en liant l'ADN à travers son domaine *paired* et son homéodomaine, et a également un grand potentiel pour former des complexes avec d'autres protéines, incluant d'autres facteurs de transcription²⁵⁵. Tous ces éléments contribuent à la modulation des effets de Pax6 dans les différents tissus et à la complexité de sa fonction.

2.4 Fonctions de Pax6 dans le développement du système nerveux central

Pax6 est exprimé selon un patron spécifique spatio-temporel pendant le développement du système nerveux central et joue un rôle important dans plusieurs processus de développement comprenant la régionalisation du tube neural, la différenciation et la migration des neurones et la formation des circuits neuronaux²⁸¹.

2.4.1 Rôles de Pax6 dans la régionalisation du prosencéphale

L'expression de Pax6 commence très tôt lors du développement du système nerveux central (jour E8 chez la souris), lorsque la plaque neurale est entièrement constituée de cellules neuroépithéliales en prolifération (Figure 10A); au jour E10 chez la souris, Pax6 est exprimé dans le prosencéphale, dans le rhombencéphale et dans la moëlle épinière²⁸².

Le prosencéphale en développement est constitué de deux régions principales: le télencéphale, qui se développera en cortex et en ganglions basaux, et le diencephale, qui donnera origine principalement au thalamus²⁸³. Dans le télencéphale murin, une frontière dorso-ventrale, la frontière entre le pallium et le sous-pallium, se forme approximativement au jour E12/13 en séparant la région dorsale (pallium), qui donnera lieu au cortex, de la région ventrale (sous-pallium) qui contient les éminences ganglionnaires²⁸³. Le diencephale est sous-divisé en trois régions principales selon l'axe antéro-postérieur: le préthalamus et le thalamus (séparés par la *zona limitans intrathalmica*), et le prétegmentum; la commissure postérieure qui se forme dans le prétegmentum marque la frontière entre le diencephale et le mésencéphale²⁸³. Au niveau du prosencéphale, Pax6 est détecté initialement dans une vaste portion du neuroépithélium incluant les régions qui formeront la vésicule optique, le télencéphale et le diencephale²⁸³ (Figure 10A). Pendant la période de la neurogenèse dans le télencéphale (E10,5-E18,5), Pax6 est exprimé dans la zone ventriculaire mitotiquement

active du télencéphale dorsal et dans le neuroépithélium du pallium ventral²⁸⁴ (la région intermédiaire située dorsalement à la frontière entre le pallium et le sous-pallium); son expression est aussi observée dans une bande de cellules connectant le pallium ventral (à travers les adjacents striatum et région parastriale) avec les cellules qui expriment Pax6 dans la partie basale du télencéphale ventral (Figure 10)²⁸³. Pax6 est également exprimé à un niveau bas dans la zone ventriculaire de l'éminence ganglionnaire latérale EGL, futur striatum), mais il n'est pas exprimé dans l'éminence ganglionnaire médiale (EGM) (Figure 10B). Dans le pallium dorsal (l'isocortex primordial, qui constitue la plus grande partie du cortex) Pax6 est exprimé selon un gradient caudal (basse expression)-rostral (haute expression); son expression est aussi gradée selon l'axe medio-latéral du pallium, avec le plus haut niveau d'expression dans les progéniteurs du pallium ventral. Son expression dans le diencéphale est très étendue au jour E12,5, mais successivement devient beaucoup plus restreinte (Figure 10)²⁸³. Après la naissance, Pax6 est fortement exprimé dans différentes régions du cerveau, incluant le bulbe olfactif, l'amygdale, le thalamus et le cervelet²⁸¹. Une expression modeste est présente dans la région subgranulaire du gyrus denté de l'hippocampe (ZSG) et dans la région subventriculaire du ventricule latérale (ZSV), les deux sièges de la neurogenèse adulte.

Pax6 joue un rôle important dans la spécification de l'identité dorsale des progéniteurs corticaux lors de la régionalisation du télencéphale. Des études ont démontré que la mutation de Pax6 induit la sous-expression et la rétraction dorsale de marqueurs du pallium à la frontière entre le pallium et le sous-pallium (comme Ngn1, Ngn2, Emx1, Tbr1 et Tbr2) et l'expansion dorsale de l'expression de gènes du subpallium (incluant Gsh2, Mash1 et Dlx1) dans le pallium^{285,286}. De plus, les gènes Pax6 et Gsh2 jouent des rôles complémentaires dans la régionalisation dorso-ventrale du télencéphale: ces deux gènes ont un patron d'expression complémentaire, puisque Pax6 est exprimé dans le télencéphale dorsal (pallium) et Gsh2 dans la région ventriculaire du télencéphale ventral (sous-pallium). Dans ce contexte, Pax6 est requis pour maintenir dans le pallium l'expression des facteurs bHLH Ngn1 et Ngn2^{285,287}, qui, à leur tour, répriment les facteurs ventralisants Mash1 et

Dlx dans le cortex²⁸⁸. De son côté, Gsh2 agit en réprimant l'expression de Pax6 dans le sous-pallium, déterminant ainsi le caractère ventral de cette région²⁸⁵.

La frontière entre le pallium et le sous-pallium est marquée par des faisceaux de cellules de glie radiale; de plus, les cellules du pallium et du sous-pallium ont différentes propriétés adhésives ce qui les empêche de se mélanger²⁸⁹. En particulier, les cellules du pallium expriment la R-cadhérine, qui est essentielle pour le maintien de la frontière. Cette barrière est semi-perméable et permet la migration d'une partie des cellules ventrales des éminences ganglionnaires vers le cortex²⁹⁰ alors que les cellules corticales dorsales ne migrent pas en direction ventrale. Il a été démontré que Pax6 est important pour la limitation de l'invasion des cellules des éminences ganglionnaires vers le cortex. En effet, lorsque Pax6 est muté, les faisceaux gliaux et l'expression cortex-spécifique de la R-cadhérine sont absents et il y a une augmentation de la migration ventro-dorsale^{291,292}. Une faible migration dorso-ventrale a également été observée: ce phénomène est aussi présent dans le cerveau des mutants homozygotes pour le gène Ngn2, suggérant que Pax6 pourrait réguler les signaux responsables pour la restriction des cellules corticales dans leur territoire à travers Ngn2²⁹³.

Pax6 est impliqué dans la morphogenèse du cortex cérébral et dans la répression des structures adjacentes, telle que le striatum: des études ont montré que, tel que pour les mutants homozygotes de Pax6, les mutants homozygotes de Emx2, un gène exprimé dans la zone ventriculaire du télencéphale ventral dans un gradient rostro/latéral (haute expression)-caudo/médial (basse expression), opposé à celui de Pax6, présentent de sévères anomalies du télencéphale dorsal. En revanche, le cortex reste morphologiquement et moléculairement distinguable des structures adjacentes telles que les ganglions basaux et la fimbria²⁹⁴. Dans le double mutant Pax6^{-/-} Emx2^{-/-}, le cortex perd son identité et acquiert des caractéristiques typiques du striatum: ce travail montre que l'expression d'au moins un allèle fonctionnel de Pax6 ou de Emx2 est nécessaire et suffisant pour établir l'identité du cortex par rapport aux structures adjacentes²⁹⁴. Le même groupe de recherche a démontré que Pax6 joue un rôle dans "l'arealisation" (subdivision tangentielle en régions distinctes ayant des fonctions spécialisées) du cortex: les mutants Pax6^{-/-} montrent une réduction des

régions corticales rostro-latérales et une expansion des régions caudo-médiales, alors que, réciproquement, le mutants *Emx2*^{-/-} présentent une expansion des régions rostro-latérales et une réduction des régions caudo-médiales²⁹⁵. De plus, il y a des évidences que *Emx2* et *Pax6* inhibent chacun l'expression de l'autre dans le cortex. Ce résultats suggèrent donc que *Pax6* est requis pour conférer l'identité corticale rostro-latérale et qu'il coopère avec *Emx2* et possiblement avec d'autres facteurs dans la régulation de la régionalisation corticale²⁸³.

Pax6 est important pour la régionalisation du diencephale²⁸³. Le diencephale des embryons *Pax6*^{-/-} est divisé selon l'axe antéro-postérieur en préthalamus, thalamus et préteectum, comme les embryons *wild-type*, mais il présente plusieurs altérations dans la régionalisation de l'expression génique: la commissure postérieure entre le préteectum et le mésencéphale est absente, et les marqueurs moléculaires du mésencéphale s'étendent antérieurement dans le préteectum^{296,297}. De plus, l'expression de certains marqueurs du préteectum est inhibée. Dans le mutant l'expression de certains marqueurs du thalamus est perdue, et le thalamus exprime des marqueurs typiques du préthalamus^{298,299}. Même dans le préthalamus, il existe des anomalies de l'expression génique²⁹⁹, comme par exemple l'absence d'expression de R-cadhérine, qui est probablement responsable des erreurs dans la trajectoire de la migration des axones dans le passage à travers la commissure post-optique observés dans le mutant³⁰⁰.

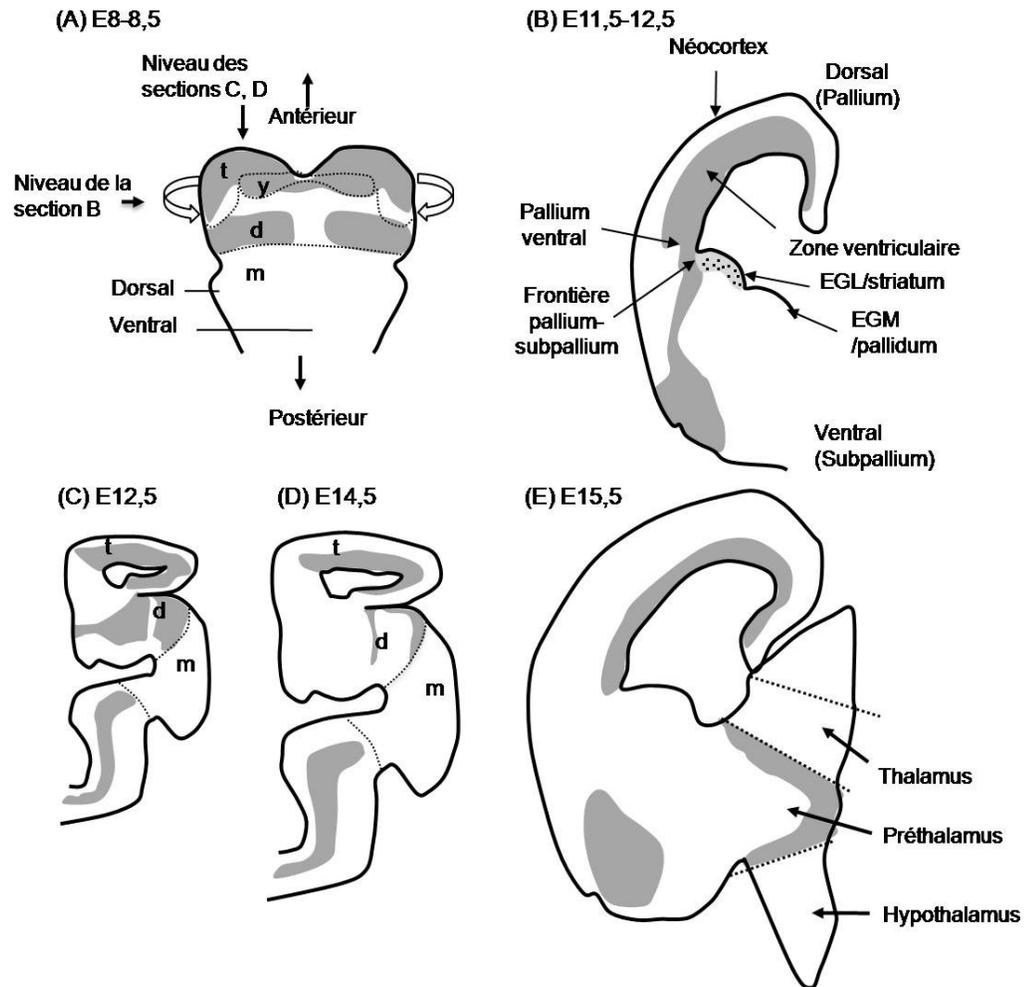


Figure 10: Profil d'expression de Pax6 dans le prosencéphale murin en développement de E8 à E15.5.

(A) Expression de Pax6 à E8-8,5 dans des régions de la plaque neurale qui deviendra le télencéphale (t), les yeux (y) et le diencéphale (d), mais pas dans le futur mésencéphale (m). (B et E) Sections coronales coupées à travers la vésicule télencéphalique gauche à E11,5-12,5 et E15,5 respectivement. Les bas niveaux de Pax6 dans la zone ventriculaire de la EGL (éminence ganglionnaire latérale) sont représentés par la zone en pointillés. (C et D) Sections parasagittales à travers le prosencéphale à E12,5 et E14,5. Pax6 est exprimé selon un gradient rostro/latéral (haut)-caudio/médial (bas). Adaptée de Manuel and Price, 2005²⁸³.

2.4.2 Pax6 dans la neurogenèse

Pax6 est exprimé dans les cellules souches neurales à partir des stades initiaux du développement du système nerveux central²⁸¹. L'analyse détaillée des anomalies développementales cérébrales des hétérozygotes *Sey^{Neu}* a révélé des aberrations fréquentes dans l'épithélium germinatif du télencéphale, diencéphale et métencéphale²⁷¹. Les embryons mutants homozygotes n'ont pas d'œil et de nez et meurent tôt après la naissance²⁷⁰: dans ces mutants, le développement du cortex cérébral est sévèrement compromis, aboutissant à une plaque corticale plus mince^{301,302}. Plusieurs résultats ont suggéré l'hypothèse que Pax6 promeut la différenciation neuronale²⁸¹. De nombreuses études ont également montré que Pax6 promeut la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches neurales^{303,304}. Tous ces travaux ont montré différents aspects du rôle de Pax6 dans la prolifération et dans la différenciation cellulaire²⁸¹. L'ensemble des données présentes dans la littérature montre que la fonction de Pax6 est complexe et hautement contexte et dose-dépendante, et que ses effets sont issus de son interaction avec plusieurs autres facteurs de transcription. Une étude très récente effectuée *in vivo* sur les voies moléculaires régulées par Pax6 a amené à une unification des résultats expérimentaux jusqu'à maintenant disponibles, en conduisant à l'élaboration d'un modèle selon lequel Pax6 agit dans le contexte d'un réseau moléculaire régulant la neurogenèse des cellules souches corticales. D'après ce modèle, Pax6 est essentiel de façon dose-dépendante pour l'équilibre entre l'auto-renouvellement des cellules souches et la neurogenèse³⁰⁵. Une illustration des résultats issus de certains travaux parmi les plus significatifs disséquant les rôles de Pax6 dans ces processus ainsi qu'une présentations des hypothèses actuelles unifiant ces résultats seront effectuées.

Pax6 est exprimé dans les cellules neuroépithéliales et de la glie radiale, qui constituent les précurseurs des neurones et des cellules gliales dans le cerveau, et contrôle leur différenciation⁴⁰; Heins et al. ont démontré que les cellules de la glie radiale isolées des embryons Pax6 *-/-* au jour E14 ont un potentiel neurogénique réduit comparés au *wild-type*,

suggérant que Pax6 est un déterminant intrinsèque du potentiel neurogénique de la glie radiale⁴⁶. Une autre étude a montré que Pax6 contrôle la prolifération des progéniteurs neuroépithéliaux de la vésicule optique, analysée au jour E9,5: ces progéniteurs, qui dans le *wild-type* expriment Pax6, sont plus abondants dans la vésicule optique du mutant (Pax6^{LacZ/LacZ}) et présentent une augmentation de la prolifération⁴²; *in vitro*, les cellules mutantes génèrent plus de divisions symétriques et ont une tendance réduite à sortir du cycle cellulaire. La surexpression de Pax6 réprime la prolifération des progéniteurs et la formation de colonies secondaires dans des essais clonaux, suggérant que Pax6 agit de façon intrinsèque (*cell-autonomously*) sur la prolifération des progéniteurs neuroépithéliaux⁴². De plus, les mutants présentent *in vitro* et *in vivo* un niveau d'expression réduit des inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes, qui régulent négativement la progression du cycle cellulaire, ce qui pourrait expliquer le phénotype observé⁴².

La fonction de Pax6 pendant le développement de la rétine est contexte-dépendante. En effet, la mutation conditionnelle de Pax6 dans la rétine au jour E10,5 (mutants Pax6^{α-CRE}) cause une réduction de la prolifération des progéniteurs rétiniens et produit seulement un type spécifique de neurones, en partie à cause de l'absence d'activation de certains gènes proneuronaux spécifiques³⁰⁶. Cette étude, effectuée par Marquardt et al. suggère donc que Pax6 est important pour la multipotence des progéniteurs des neurones rétiniens³⁰⁶. Une autre étude montre une diminution de la prolifération et l'augmentation de la neurogenèse dans la rétine Pax6^{-/-} (mutants Pax6^{Sey^{Neu1}}) et suggère un rôle de Pax6 dans l'inhibition de la différenciation neurale³⁰⁴. Xu et al. montrent que Pax6 est requis pour la prolifération et l'expansion des cellules souches rétiniennes, à travers des expériences effectuées sur la rétine embryonnaire (E14) du mutant Pax6^{LacZ/LacZ} et de l'adulte Pax6^{α-CRE}³⁰⁷.

Les résultats de tous ces travaux suggèrent que la fonction biologique de Pax6 pourrait être influencée par l'expression d'autres facteurs de transcription et pourrait changer tout au long du développement en raison de modifications dans le microenvironnement et dans l'état de compétence des progéniteurs⁴². Alternativement, Pax6 pourrait moduler des

activités conflictuelles qui sont en conditions normales (ex. prolifération et différenciation) en état d'équilibre⁴². Les résultats apparemment conflictuels entre les différents groupes pourraient également dériver des différents stades du développement étudiés et des différents mutants utilisés (Pax6^{Sey}, Pax6^{LacZ}, mutant conditionnel Pax6^{α-CRE}). Les mutations nulles Sey (Sey: spontanée, Sey^{Neu}: issue d'une expérience de mutagenèse à l'éthylnitrosourea) produisent des protéines Pax6 tronquées à différentes positions sur la séquence, alors que la mutation Pax6^{LacZ} est due au remplacement du codon d'initiation et de tout le domaine *paired* avec une cassette exprimant la β-galactosidase^{278,308}. Ces mutations produisent des protéines différentes considérées comme non fonctionnelles, dont l'expression cause un phénotype comparable, mais dont l'activité résiduelle n'a pas encore été déterminée²⁵⁵.

Une étude effectuée au niveau du cortex cérébral des mutants nuls à différents stades du développement embryonnaire a montré que Pax6 régule le cycle cellulaire et le taux de progression de la division symétrique (qui cause l'expansion du pool de cellules souches) à la division asymétrique (qui corrèle avec la différenciation) dans les progéniteurs corticaux³⁰³: en l'absence de Pax6, le cycle cellulaire, les division asymétriques et l'expression des marqueurs des neurones post-mitotiques sont accélérés au début de la neurogenèse corticale. Par contre, l'analyse du cycle cellulaire dans une phase plus avancée de la neurogenèse montre que l'absence de Pax6 produit un cycle cellulaire plus lent: ce paradoxe pourrait être expliqué avec un effet contexte-dépendant de Pax6 ou par le fait qu'à cause de la rapide prolifération observée dans le mutant au début de la neurogenèse, les composants cellulaires essentiels pour la division n'ont pas le temps d'être de nouveau synthétisés³⁰³. Une autre étude, effectuée par le même groupe, basée sur l'utilisation de souris chimères Pax6^{+/+} ↔ Pax6^{-/-}, a permis de comparer la quantité de cellules des deux génotypes dans le même animal et de tester si les anomalies persistent même en présence des cellules *wild-type* pour évaluer si au niveau cellulaire le rôle de Pax6 est intrinsèque (*cell-autonomous*) ou non (*cell nonautonomous*)³⁰⁹. Cette étude a montré que Pax6 exerce trois rôles intrinsèques dans le cortex en développement: le maintien de la taille du pool de progéniteurs corticaux, l'activation de Tbr2, un gène exprimé par les progéniteurs basaux et

par les neurones post-mitotiques précoces, et la répression dans le cortex des gènes normalement exprimés ventralement, dans l'éminence ganglionnaire. Dans cette étude, les auteurs n'ont pas observé de différence dans la longueur du cycle cellulaire entre les cellules mutantes et les *wild-type*, et ils expliquent cette discordance avec l'étude précédente par la différence au niveau de la technique utilisée. Par contre, ils ont observé que les cellules Pax6^{-/-} sortent du cycle cellulaire en plus grand nombre que les *wild-type*, provoquant ainsi la déplétion des progéniteurs et la neurogenèse précoce. La réduction du nombre de progéniteurs neuronaux serait à la base de la diminution de l'épaisseur du cortex cérébral observée. De plus, ils observent que dans le mutant, il y a une sous-expression du gène Tbr2, qui perd en plus sa caractéristique d'expression gradée à travers le cortex: il s'agit d'un gène normalement exprimé dans les progéniteurs basaux. Ces cellules n'expriment pas Pax6 chez le *wild-type*, mais Pax6 est probablement nécessaire pour garder le patron d'expression correct de ce gène. Les cortex mutant présentent en plus l'expression aberrante des marqueurs ventraux Mash1, Gsh2 et Dlx2 ; les auteurs supposent donc que la perte de l'expression gradée de Tbr2 empêche la spécification correcte des progéniteurs basaux dans les mutants ainsi contribuant à la perte de régionalisation corticale observée dans plusieurs études dans les embryons Pax6^{-/-} ^{294,310}.

Pour comprendre les bases moléculaires des différents effets de Pax6 lors de la neurogenèse, en 2009, Sansom et collègues ont effectué une étude qui a amené à l'élaboration d'un modèle unifiant les multiples rôles de ce gène³⁰⁵. L'objectif de ce travail était de définir les réseaux génétiques directement et indirectement régulés par Pax6 dans les cellules souches et dans les progéniteurs corticaux, et de caractériser les réseaux biologiques dont Pax6 est un composant³⁰⁵. Pour ce faire, les auteurs ont combiné l'analyse des sites génomiques de liaison de Pax6, effectuée par la technique du ChIP-chip (*Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip*) à partir de néocortex embryonnaires (E12,5), avec l'analyse des gènes régulés par Pax6 avec l'évaluation par puces à ADN de l'expression génique des cortex embryonnaires après l'ablation ou la surexpression de Pax6. En analysant l'intersection entre l'ensemble des gènes dont le promoteur est lié par Pax6 et les gènes dont l'expression est régulée par Pax6, ils ont défini les gènes directement

contrôlés par Pax6. Ils ont ensuite intégré ces données avec les résultats d'études précédentes effectuées sur d'autres facteurs de transcription ayant un rôle dans le contrôle de la neurogenèse corticale, plus particulièrement Ngn2, Hes1 et Mash1, afin de définir le réseau biologique où Pax6 opère.

Les résultats de cette analyse montrent que Pax6 contrôle positivement l'expression des gènes promulguant l'auto-renouvellement, la progression à travers le cycle cellulaire et le maintien des cellules souches neurales, et que Pax6 contrôle indirectement l'expression des cyclines de classe D, de Hes5 et des ligands Notch, qui promeuvent également l'auto-renouvellement des cellules souches. Pax6 réprime aussi l'expression des gènes qui déterminent la production des interneurons inhibiteurs, typiques du télencéphale ventral, comme *Isl1* (*insulin gene enhancer binding protein 1*) et *Mash1*. Ces effets sont en accord avec les résultats démontrant que la mutation de Pax6 induit la sortie précoce du cycle cellulaire et la neurogenèse précoce, provoquant ainsi la déplétion des progéniteurs et la réduction de la taille du cortex, en plus de provoquer la surproduction des interneurons inhibiteurs. Pax6 promeut également la neurogenèse, induisant entre autres l'expression du gène suppresseur de tumeur PTEN (*phosphatase and tensin homolog*). De plus, il promeut l'expression de gènes promulguant la genèse des progéniteurs basaux, comme *Tbr2*: ensemble, ces fonctions indiquent que l'un des rôles biologiques de Pax6 est de promouvoir la neurogenèse en augmentant le nombre de cellules souches qui sortent du cycle cellulaire et qui se différencient en progéniteurs basaux et ensuite en neurones. Ces fonctions se reflètent dans le phénotype des souris surexprimant Pax6, où il y a une production trop précoce de progéniteurs basaux et de neurones matures, qui amène à la déplétion du pool de cellules souches et à la réduction de la taille du cortex dans le développement embryonnaire tardif. Les auteurs proposent donc qu'il existe un niveau optimal de Pax6 qui détermine l'équilibre entre l'auto-renouvellement des cellules souches neurales et la neurogenèse: l'augmentation de ce niveau cause la différenciation trop précoce des cellules souches en progéniteurs basaux, alors que la réduction de ce niveau cause la sortie trop précoce des cellules souches du cycle cellulaire et la neurogenèse prématurée. Lorsque Pax6 est

surexprimé, il n'y a pas d'augmentation de l'auto-renouvellement car ses effets sur la promotion de la production de progéniteurs basaux et de neurones sont prédominants.

A travers la comparaison avec des études d'analyse des profils d'expression présentes dans la littérature, les auteurs ont démontré que plusieurs gènes dont l'expression est régulée par Pax6, sont aussi régulés par d'autres facteurs qui ont un rôle dans la neurogenèse corticale et dans l'établissement du destin cellulaire neuronal, comme Hes1, Ngn2 et Mash1. Cette étude a conduit à l'hypothèse que Pax6 fait parti d'un circuit transcriptionnel "core" contrôlant l'auto-renouvellement des cellules souches et la neurogenèse (Figure 11). Pax6 régule positivement l'expression de Ngn2 et agit en synergie avec Ngn2 dans la promotion de la genèse des progéniteurs basaux et par conséquent dans la production de neurones excitateurs de projection du cortex, alors que Hes1 s'oppose à ces processus en réprimant la plupart des mêmes gènes. Mash1 a une fonction complexe: il promeut aussi la genèse des progéniteurs basaux, et induit l'expression de facteurs de transcription qui promeuvent la genèse des interneurons inhibiteurs (comme Isl1 et Lhx8). Pax6 et Hes1 répriment Mash1, et Pax6 réprime Isl1 et Lhx8, ainsi inhibant les fonctions pro-interneurones de Mash1³⁰⁵.

Comme décrit ci-dessus, Pax6 exerce différents rôles de façon dose-dépendante. Par contre, ces effets distincts ne sont pas dus à l'oscillation du niveau d'expression de Pax6, qui reste constant. En revanche, les niveaux d'expression d'Hes1 et Ngn2 oscillent dans les cellules souches corticales³¹¹, de façon Notch-dépendante dans le cas de Hes1. Le modèle présenté dans l'étude de Samson et al. prévoit qu'en présence de la signalisation Notch, l'augmentation de l'activité de Hes1 et Hes5 supprime la neurogenèse et promeut l'auto-renouvellement, en partie par la répression de Ngn2, et que cet effet est incrémentée par l'activation de l'expression de Hes5 par Pax6. En l'absence du signal Notch et de l'activité de Hes1, l'augmentation de Ngn2 induite par Pax6 et l'induction résultante de la neurogenèse n'ont pas d'opposition, ainsi permettant à Pax6 de promouvoir la neurogenèse (Figure 11).

Figure 11: Schéma illustrant le circuit moléculaire régulé par Pax6 contrôlant l'auto-renouvellement et la neurogenèse dans les cellules souches neurales du cortex cérébral.

Ce circuit régulateur a été élaboré par Sansom et al.³⁰⁵ sur la base des données obtenues à travers l'analyse des sites génomiques de liaison de Pax6 au niveau des promoteurs et l'analyse des gènes régulés par Pax6 après ablation ou surexpression, combinés avec des données présentes dans la littérature sur les gènes régulés par Ngn2, Mash1 et Hes1. Le schéma (A) illustre l'architecture du circuit. Pax6 régule positivement Ngn2 et régule négativement Mash1, et réprime directement et indirectement les facteurs Isl1 et Lhx8 (*LIM homeobox protein 8*), impliqués dans la genèse des interneurons inhibitoires. Ces interactions ont comme effet la promotion de la genèse des neurones de projection glutamatergiques. Pax6 régule aussi positivement les gènes impliqués dans la genèse des progéniteurs basaux, comme Tbr2. Les lignes épaisses représentent la régulation directe, les lignes fines représentent des résultats d'études d'expression³⁰⁵. (B) et (C) Le niveau d'expression de Pax6 est constant dans les cellules souches neurales, comparé aux variations des niveaux d'expression de Ngn2 et Hes1. Le schéma (B) illustre la prédiction des effets sur l'auto-renouvellement et la neurogenèse quand le niveau de Hes1 est élevé (voie Notch active): dans ces conditions, Hes1 antagonise la régulation positive de Ngn2 induite par Pax6, et cela a comme résultat la suppression de la neurogenese³⁰⁵. Le schéma (C) illustre la prédiction des effets sur l'auto-renouvellement et la neurogenèse quand le niveau de Hes1 est élevé (voie Notch active): dans ces conditions, Pax6 régule positivement l'expression de Ngn2, sans être opposé par Hes1. Pax6 et Ngn2 coopèrent pour promulguer la neurogenèse et la production de progéniteurs basaux³⁰⁵. Adaptée de Sansom et al., 2009³⁰⁵.

Certains rôles de Pax6 dans la régionalisation du cerveau et la neurogenèse sont attribuables aux effets de ce gène sur le niveau d'expression de protéines impliquées dans l'adhésion intercellulaire²⁸¹. Les propriétés adhésives des cellules sont essentielles pour la formation de régions distinctes comprenant des cellules ayant des propriétés identiques. Pax6 régule l'expression de la R-cadhérine, nécessaire pour le maintien de la frontière entre le pallium et le sous-pallium^{289,312}, et de l'optimedine, qui induit la N-cadhérine, la β -caténine, l' α -caténine et l'occludine³¹³. De plus, Pax6 régule directement l'expression de la δ -caténine/ neurojuline, une protéine du cytosquelette localisée dans les jonctions adhérentes impliquées dans l'adhésion des cellules neuroépithéliales et pouvant moduler la croissance des neurites et le turnover des N-cadhérines³¹⁴. Puisque les cellules isolées se différencient en neurones par défaut, la régulation de l'adhésion des cellules neuroépithéliales pourrait être importante pour maintenir la prolifération²⁸¹. Pax6 régule aussi l'expression de TN-C (*tenascin C*), une glycoprotéine de la matrice extracellulaire ayant un rôle dans la prolifération des progéniteurs neuronaux et dans la différenciation des oligodendrocytes⁴⁰.

En ce qui concerne la neurogenèse post-natale, chez l'adulte Pax6 est exprimé dans différentes régions du cerveau, incluant le bulbe olfactif, l'amygdale, le thalamus et le cervelet²⁸¹. Il est également exprimé dans les régions neurogéniques adultes, la ZSV^{315,316} et la ZSG^{317,318}. Dans la ZSV il a principalement été observé dans les progéniteurs en active prolifération (cellules de type C)³¹⁵ et dans les neuroblastes qui donnent origine aux interneurons du bulbe olfactif^{315,316}, qui dérivent des cellules souches neurales adultes (cellules de type B), et semble être impliqué dans la spécification neuronale, la différenciation et/ou le maintien de différentes classes d'interneurones olfactifs^{276,315,316}.

Dans la ZSG Pax6 est exprimé par les cellules souches neurales adulte qui résident dans cette région, les astrocytes radiaux (cellules de type I), et il est impliqué dans le contrôle de la prolifération et du maintien de ces cellules, probablement à travers le contrôle de l'expression des ligands de la voie de signalisation Wnt³¹⁷; il est également exprimé par les progéniteurs de type D (cellules de type II)^{317,318}, par les astrocytes horizontaux, par des

neurones granulaires immatures et par des astrocytes matures³¹⁸. Pax6 pourrait jouer un rôle dans le balance entre prolifération et neurogenèse chez l'adulte, même si les bases moléculaires de ces fonctions ne sont pas encore bien clarifiées²⁸¹.

2.4.3 Expression et fonctions dans les astrocytes

Pax6 est exprimé dans les progéniteurs des astrocytes au cours du développement. Il est spécifiquement localisé dans les cellules de la glie radiale du cortex (mais pas dans le télencéphale basale), et il joue un rôle essentiel dans le développement de ces cellules⁴⁰. L'expression de Pax6 a également été observée dans les astrocytes matures de l'hippocampe³¹⁷⁻³¹⁹. De plus, l'expression de Pax6 co-localise avec l'expression du marqueur des astrocytes GLAST dans les précurseurs astrocytaires de certaines régions de la moëlle épinière de souris³²⁰. Pax6 joue un rôle dans la détermination de l'identité positionnelle des astrocytes de la moëlle épinière, qui est à la base de la différenciation de sous-types distincts d'astrocytes ayant différentes localisations et expression de marqueurs moléculaires^{321,322}.

Une étude conduite en 2008 a montré que Pax6 est exprimé dans les progéniteurs des astrocytes et dans les astrocytes matures dans le système nerveux central *in vitro* et *in vivo* et, à travers des expériences effectuées en utilisant comme modèle les embryons de souris mutant nuls pour Pax6, les auteurs ont montré que Pax6 inhibe la prolifération et promeut la maturation des astrocytes³¹⁹. Puisque les mutants nuls pour Pax6 ne sont pas viables après la naissance et que les astrocytes se différencient dans le cortex aux alentours de la naissance, ces résultats ont été obtenus *in vitro* sur des cultures d'astrocytes effectuées à partir de progéniteurs présents dans le cortex cérébral embryonnaire. Les auteurs ont également observé une augmentation transitoire de la prolifération et de la présence d'astrocytes immatures *in vivo* dans la moëlle épinière des embryons mutants comparé au *wild-type* (dans la moëlle épinière la production d'astrocytes commence plus précocement

que dans le cortex). Ils suggèrent que l'augmentation de la prolifération observée dans le mutant est due à l'augmentation de l'activation de Akt observée dans les astrocytes en culture³¹⁹.

Ces résultats sont en accord avec l'observation que le niveau d'expression de PAX6 est significativement réduit dans des échantillons de gliome malin humaine (les cancers primaires malins du cerveau les plus communs et agressifs chez l'humain, ayant une nature gliale) et inversement corrélé avec le grade de la tumeur, et qu'un bas niveau d'expression de ce gène prédit un mauvais pronostic pour les patients atteints de gliome astrocytaire malin³²³. De plus, la surexpression de PAX6 supprime la croissance des cellules de glioblastome humain injectées chez la souris³²⁴.

Hypothèse de recherche et objectifs

Pax6 est un facteur de transcription à homéodomaine et domaine *paired* hautement conservé, ayant des rôles essentiels dans le développement embryonnaire de plusieurs tissus de l'organisme²³⁹. Il est exprimé à partir des stades précoces du développement du système nerveux central et est essentiel pour la régionalisation du cerveau et de la moëlle épinière^{239,283}. Il est exprimé dans les cellules neuroépithéliales et dans les cellules de la glie radiale, les précurseurs de toutes les cellules neuronales et gliales du cerveau^{40,281,282}. Il exerce ses effets de façon contexte dépendant et a plusieurs fonctions dépendantes de son expression tissu-spécifique, de ses isoformes et de l'interaction avec différents facteurs de transcription²⁵⁵. En particulier, il fait partie d'un réseau moléculaire actif pendant la neurogenèse, et est essentiel lors de la régulation de l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches neurales³⁰⁵. Pax6 est également exprimé dans les cellules souches neurales adultes de l'hippocampe, ayant une nature astrogliale^{317,318}, et dans les progéniteurs en active prolifération et dans les neuroblastes de la ZSV^{315,317,318}, et des études récentes montrent qu'il est capable de réprimer la croissance des cancers cérébraux de nature gliale³²⁴. De plus, une étude conduite *in vitro* sur des cultures d'astrocytes effectuée à partir des cellules souches neurales embryonnaire et *in vivo* sur la moëlle épinière embryonnaire, utilisant comme modèle une souris mutante nulle pour Pax6, montre que ce gène semble avoir un rôle dans le contrôle de la prolifération et de la maturation des astrocytes³¹⁹. Des données obtenues récemment dans notre laboratoire (Duparc R., non publiées), montrent qu'au niveau de la rétine, qui fait partie du système nerveux central, Pax6 pourrait avoir un rôle dans la production des cellules gliales: des expériences d'induction de la différenciation des cellules souches rétinienne *wild-type* et mutantes nulles pour Pax6 *in vitro*, montrent en effet que les cellules mutantes présentent une réduction du potentiel gliogénique.

Ces observations nous ont suggérés l'hypothèse suivante: Pax6 pourrait être impliqué dans la génération et de la différenciation des astrocytes dans le système nerveux central.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer le rôle de Pax6 dans ces processus à travers l'utilisation de modèles murins mutants pour Pax6.

Objectifs spécifiques

1.1 Évaluation du rôle de Pax6 dans la génération des astrocytes par les cellules souches neurales embryonnaires.

Pax6 est exprimé tout au long de la lignée évolutive des astrocytes, par les cellules neuroépithéliales, les cellules de la glie radiale et les astrocytes parenchymateux^{40,42,281,282,315,319}, suggérant qu'il pourrait être impliqué dans la différenciation des astrocytes. Pour évaluer le rôle de ce gène dans l'induction de la compétence gliogénique des cellules souches neurales embryonnaires, nous avons utilisé un modèle murin mutant nul pour Pax6, présentant la mutation Pax6^{LacZ}, où le codon d'initiation et tout le domaine *paired* sont remplacés par une cassette galactosidase-néomycine^{278,308}. Nous avons donc effectué des expériences *in vitro* de culture de cellules souches neurales embryonnaires isolées du cerveau des embryons au stade final de développement embryonnaire, coïncidant avec le début de la différenciation des astrocytes.

1.2 Évaluation du rôle de Pax6 dans le développement des astrocytes *in vivo*

À cause des nombreux rôles essentiels de Pax6 dans le développement embryonnaire de plusieurs tissus de l'organisme, les mutants nuls meurent rapidement après la naissance^{239,278}, et ne permettent pas d'étudier le rôle de ce gène dans le développement

post-natal. La production des astrocytes commence à partir du jour E17, avec un sommet de production entre les deux premiers jours postnataux, jusqu'à la deuxième semaine de vie⁹³. Les souris mutantes nulles, même si elles sont utiles dans l'étude du rôle de Pax6 dans l'octroi de la compétence gliogénique des cellules souches neurales embryonnaires, ne permettent pas d'analyser ses fonctions dans la différenciation et dans le développement post-natal des astrocytes. À cette fin, nous avons utilisé un modèle murin mutant conditionnel pour Pax6, en utilisant le système CRE/ loxP: nous avons croisé des souris transgéniques exprimant la recombinaise CRE sous le contrôle du promoteur hGFAP (*human GFAP*)³²⁵, actif dans les progéniteurs des astrocytes et dans les astrocytes matures^{30,325}, avec des souris ayant certains exons du gène Pax6 flanqués par les sites de recombinaison spécifique loxP³²⁶, pour obtenir des souris ayant les deux modifications³²⁷. Chez ces souris, la recombinaise CRE cause la recombinaison au niveau des sites loxP, provoquant par conséquent la délétion des exons de Pax6 flanqués par ces sites et l'inactivation du gène, spécifiquement au niveau de ces cellules. Ces souris, qui sont viables et grandissent jusqu'à l'âge adulte, sont donc utiles pour étudier le rôle de Pax6 dans le développement et la fonction des astrocytes après la naissance.

Matériels et méthodes

1. Animaux

Les souris Pax6^{LacZ} 278 (mutants nuls) nous ont été offertes par le Dr. Peter Gruss (Max-Planck Institute, Göttingen, Allemagne). Chez ces souris, le codon d'initiation et tout le domaine *paired* sont remplacés avec la cassette galactosidase-neomycine pGNA^{308,328}. La lignée a été maintenue dans un fond (*background*) CD1; les souris CD1 *wild-type* (Hsd:ICR, CD-1[®]) proviennent de chez Harlan Laboratories.

Les souris Pax6^{flox} 326 (mutants conditionnels) ont été offertes par le Dr. Rod Bremner (Université de Toronto). Dans le locus Pax6, un site loxP est situé dans l'exon 4 en amont du premier ATG; le second site loxP est situé entre les exons 6 et 7. La lignée a été maintenue dans le background CD1.

Les souris hGFAP-CRE³²⁹ (FVB-Tg(GFAP-cre)25Mes/J) proviennent de chez The Jackson Laboratory. Pour produire ces souris³²⁹, un fragment d'ADN codant pour la recombinaise CRE a été inséré dans une cassette d'expression contenant le promoteur gfa2³³⁰, une région de 2,2 Kb flanquant le 5' du gène GFAP humaine (hGFAP). Le signal de localisation nucléaire de l'antigène grand T de SV40 a été inséré à l'extrémité N-terminale de la région codante, pour augmenter l'efficacité de l'excision de l'ADN par la recombinaise³³¹. À l'extrémité 3', un intron et un signal de polyadénylation hétérologues ont été insérés à partir de séquences du gène de la protamine 1³²⁹. La lignée a été maintenue dans un fond FVB. Les souris FVB *wild-type* (FVB/NHsd) proviennent de chez Harlan Laboratories.

Tous les animaux utilisés ont été traités en accord avec les recommandations du Conseil Canadien de protection des Animaux (CCPA) décrites dans le "*Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation*" et avec tous les règlements internes de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont et du Centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont selon le Comité de protection des animaux.

Détermination du génotype des souris

Des biopsies de queue d'environ 3 mm de longueur ou des biopsies d'oreille d'environ 1 mm de diamètre ont été prélevées au moment du sevrage. L'ADN a été extrait en utilisant le kit RED Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich, Oakville, ON). La détermination du génotype a été effectuée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*, réaction en chaîne par polymérase) en utilisant le réactif "Red PCR Ready mix" contenu dans le même kit. Pour chaque réaction, on a utilisé 5 µL de ce réactif, 20 ng de chaque amorce, 2 µL d'ADN de souris et complété à 10 µL avec de l'eau. Pour les souris Pax6^{LacZ}, on a utilisé des amorces permettant d'amplifier une séquence de l'allèle *wild-type* (120 bp):

sens: 5`-GAGACTGGCTCCATCAGACC-3`

antisens: 5`-TTCCCAAGCAAAGATGGAAG-3`

et des amorces permettant d'amplifier une séquence de la cassette lacZ (345 bp):

sens: 5`-TGGGTTTGGTGTCTTAGGC-3`

antisens: 5`-CACGACGTTGTAACGACGG-3`.

Pour les souris Pax6^{flox}, on a utilisé des amorces permettant de distinguer l'allèle *wild-type* (300 bp) de l'allèle flox (400 bp):

sens: 5`-GCGGTTGAGTAGCTCAATTCTA-3`

antisens: 5`-AGTGGCTTGGACTCCTCAAGA-3`

Pour les souris hGFAP-CRE, on a utilisé des amorces amplifiant une séquence du transgène (120 bp):

sens: 5`-CCTGATGGACATGTTTCAGGG-3`

antisens: 5`-CTTCAGGTTCTGCGGGAAAC-3`

Les conditions pour les réactions de PCR ont été les suivantes:

Pour Pax6^{LacZ}:

94°C 15 min

94°C 30 sec

55°C 30 sec

72°C 1 min

} 35 cycles

Pour Pax6^{flox} et pour hGFAP-CRE:

95°C 15 min

94°C 30 sec

54°C 30 sec

72°C 1 min

} 35 cycles

72°C 10 min

72°C 10 min

L'analyse des produits de PCR a été faite par électrophorèse sur gel d'agarose 1% en tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA).

2. Culture de cellules souches neurales embryonnaires

Les cultures de cellules souches neurales embryonnaires ont été établies en suspension unicellulaire par dissociation mécanique des lobes corticaux des embryons de souris. Le jour de gestation correspondant au stade de développement embryonnaire a été établi sur la base de la présence du bouchon vaginal (E0,5). Les souris gestantes au jour 18,5 de gestation (E 18,5) ont été euthanasiées par dislocation cervicale et les embryons prélevés chirurgicalement et placés dans une solution oxygénée composée de HBSS 1X (Hank's Balanced Salt Solution, Invitrogen, Burlington, ON), glucose 0,25% et Hepes 10 mM (Invitrogen) ("solution HBSS"). Les lobes corticaux ont été isolés et les méninges ont été enlevées. Les lobes ont par la suite été coupés à l'aide d'un scalpel (BD Bard-Parker™ #21, BD Biosciences, Bedford, MA) en petits fragments, et incubés dans une solution de trypsine (TripLE™ Express, Invitrogen): solution HBSS (1:1) pendant 10 minutes à 37°C et rincés une fois avec solution HBSS. Les morceaux de tissu ont été dissociés mécaniquement à l'aide d'une pipette munie de tips 1000 µL (10x). Les suspensions cellulaires ont été centrifugées 5 minutes à 300 g et les cellules resuspendues dans un milieu de culture composé de DMEM: F12 (1:1) (Invitrogen), glucose 0,25% (Sigma-Aldrich), héparine 2 µg/mL (Sigma-Aldrich), Gentamycine 25 µg/mL (Invitrogen), 1 % supplément B27 (Invitrogen), FGF2 recombinant humaine 10 ng/mL et EGF recombinant humaine 20 ng/mL (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Les cellules ont été mises en culture à une densité de $2,5 \times 10^3$ /mL en plaques six puits non-adhérentes (Sarstedt, Montréal, QC) dans un volume de 2,5 mL/puits, à 37°C et 5% CO₂. Au bout de 7-8 jours, les cellules souches forment des clones sphériques qui poussent en suspension, appelés neurosphères. Les passages cellulaires ont été effectués en plaçant les neurosphères dans une solution de

dissociation "Enzyme Free Cell Dissociation Solution Hank's Based 1X" (Millipore, Billerica, MA) pendant 15 minutes à 37°C. Les agrégats de cellules ont ensuite été récupérés après centrifugation pendant 5 min à 300 g, resuspendus dans 1 mL de milieu de culture et triturés à l'aide d'une seringue de 1 mL munie d'aiguille 20G1 (10x) et 22G1 (5x) (BD Biosciences) pour obtenir une suspension unicellulaire, qui a été mise en culture dans les mêmes conditions décrites ci-dessus. Pour les analyses statistiques du nombre et de la taille des neurosphères, les photos ont été prises avec une caméra Megapixel Firewire Camera (PixeLink, Vitana Corporation, Ottawa, ON) connectée à un microscope optique Leica DMIL (Richmond Hill, ON).

3. Western Blot

Les neurosphères ont été homogénéisées dans une solution contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche Diagnostics, Laval, QC) et soniquées 2 fois pendant 10 secondes à une amplitude de 30% avec un sonicateur Branson Digital Sonifier (Markham, ON). Les protéines contenues dans le lysat cellulaire ont été quantifiées avec la méthode de Bradford (BioRad Protein Assay, BioRad, Mississauga, ON) et dénaturées pendant 5 minutes à 95°C en présence de tampon de Laemmli 1x. Les protéines ont été séparées par électrophorèse en conditions dénaturantes sur un gel de polycramide à 10% contenant du dodécylsulfate de sodium et transférées sur une membrane de nitrocellulose (BioRad). Le marqueur de taille moléculaire utilisé est le BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen). Après transfert, la membrane a été bloquée dans une solution de TBS (Tris buffer saline)-Tween 20 0,05% (Tween 20, Sigma-Aldrich) contenant 5% de lait en poudre écrémé pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Elle a été ensuite incubée avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-Tween 0,05% contenant 1% de lait écrémé pendant 16 heures à 4°C sous agitation. Après trois lavages dans du TBS-Tween 0,05%, la membrane a été incubée pendant 1 heure en présence de l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (Sigma-Aldrich) dilué au 1/15 000 (anti-lapin) ou au 1/10 000

(anti-souris) dans du TBS-Tween 0,05% contenant 1% de lait à température ambiante sous agitation. Après trois autres lavages, les protéines d'intérêt ont été révélées par chimioluminescence avec le kit Immobilon Western (Millipore), à l'aide d'une caméra CCD (charge-coupled device) Fujifilm LAS 4000 (Fujifilm, Mississauga, ON). Les anticorps primaires utilisés et leurs dilutions respectives sont: anti-GFAP 1: 1000 (Dako, Mississauga, ON); anti-nestine (BD Biosciences) et anti- β actine 1: 750 (Abcam, Cambridge, MA).

4. Immunomarquage

4.1 Immunofluorescence sur sections congelées

L'immunofluorescence a été effectuée sur des sections de moëlle épinière d'embryons de souris au jour de développement E18,5. La moëlle épinière a été prélevée des embryons et placée dans du HBSS. Elle a ensuite été coupée en sections coronales et fixée avec du paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes, lavée 3 fois avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) pendant 10 minutes et équilibrée pendant une nuit avec une solution de sucrose 30% à 4°C. Les segments de moëlle ont par la suite été imbibés dans le milieu d'enrobage Shandon Cryomatrix (ThermoFisher Scientific, Nepean, ON), placés dans des moules en plastique (Tissue Path Base Molds, ThermoFisher Scientific), congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Les blocs ainsi obtenus, contenant les segments de moëlle inclus en Cryomatrix, ont été démoulés et sectionnés à l'aide d'un Cryostat "Leica CM3050 S" en sections de 8 μ m. Les coupes ont été montées sur lames de microscope en verre Fisherbrand Super-Frost Plus (ThermoFisher Scientific) et laissés sécher pendant 20-30 minutes. Les sections ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS pendant 5 minutes et incubées dans une solution de blocage constituée de BSA 1% (*Bovine Serum Albumin*) (Vector Laboratories, Burlingame, CA), 0,1% Tween 20 (Sigma-Aldrich) dans du PBS

pendant 1 heure à température ambiante. Elles ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire de lapin anti-GFAP (Dako) dilué 1: 200 dans une solution de blocage pendant 16 heures à 4°C dans une chambre humide. Après trois lavages de 5 minutes dans du PBS froid, les sections ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué au fluorochrome Rhodamine (rhodamine-conjugated donkey anti-rabbit, Millipore) dilué au 1: 300 dans la solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante dans le noir. Après trois lavages de 5 minutes avec du PBS et un lavage de 2 minutes avec du tampon phosphate 0,1 M, les lames ont été contre-colorées avec un milieu de montage contenant du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, Vector Laboratories, Burlington, ON) et recouvertes de lamelles couvre-objet (VWR, Mississauga, ON). Les observations ont été faites avec le microscope à fluorescence Leica DMRE (Leica Microsystems) et les images ont été prises avec une caméra digitale (Retiga EX; QIMAGING; avec le software OpenLab, ver.3.1.1 (Open-Lab, Austin, TE).

4.2 Immunohistochimie sur sections paraffinées

Le marquage par immunohistochimie a été effectué sur des sections de cerveaux et de yeux de souris adultes âgées de 16 et 90 jours. Les souris ont été euthanasiées avec du CO₂. Les cerveaux et les yeux ont été prélevés chirurgicalement et fixés par de la formaline 10% tamponnée (ACP Chemicals Inc., Saint-Léonard, QC). Autrement, la fixation a eu lieu par perfusion intracardiaque avec du paraformaldéhyde. Les souris ont été anesthésiées avec du Somnotol (65 mg/kg) (MTC Pharmaceutical, Cambridge, ON). La cage thoracique a été ouverte et le cœur dégagé. À l'aide d'une seringue 10 mL munie d'une aiguille 26 G½, le cœur a été perfusé avec une solution de paraformaldéhyde 4% (10 mL pendant environ 3 minutes). Par la suite, les cerveaux et les yeux ont été prélevés et placés dans de la formaline 10%. Les tissus ont été ensuite inclus dans des blocs de paraffine. Les blocs ont été sectionnés avec un microtome Leica RM2165 en coupes de 0,8 µm qui ont été montées sur lames de microscope en verre Fisherbrand Super-Frost Plus (ThermoFisher Scientific).

Les sections montées sur les lames ont ensuite été déparaffinées et rehydratées avec 3 lavages de 5 minutes avec du xylène (Surgipath, Richmond, IL), 2 lavages de 10 minutes avec de l'éthanol 100% (Surgipath), 2 lavages de 10 minutes avec de l'éthanol 95% et 2 lavages 5 minutes avec de l'eau distillée. Le démasquage antigénique a été effectué par immersion des coupes dans une solution de citrate de sodium 10 mM (Anachemia, Rouses Point, NY) pH 6 portées à ébullition pendant 10 minutes. Les coupes ont été ensuite laissées refroidir pendant au moins 30 minutes.

Les sections ont été lavées 2 fois avec de l'eau distillée pendant 5 minutes et incubées dans une solution de peroxyde d'hydrogène 3% (Sigma-Aldrich) pour bloquer les peroxydases endogènes. Après 2 lavages de 5 minutes avec du tampon de lavage PBS-Tween 20 0,1% (Tween 20 par Sigma-Aldrich), les sections ont été incubées dans du tampon de blocage, constitué d'une solution de sérum de cheval (Sigma-Aldrich) 5% dilué dans le tampon de lavage, pendant 1 heure à température ambiante, et ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon de blocage pendant 16 heures à 4°C dans une chambre humide.

Par la suite, les sections ont été lavées 3 fois avec du tampon de lavage pendant 5 minutes et traitées avec le kit Vectastain® ABC kit (Vector Laboratories, Burlington, ON) (incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé et incubation successive avec le complexe avidine-biotyne-peroxydase) selon les instructions du fournisseur. Le complexe a été révélé avec le substrat chromogène brun DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Sigma-Aldrich); la réaction de coloration a été suivie par microscopie optique, et une fois le signal développé, les sections ont été immergées dans de l'eau distillée pour arrêter la réaction. Les sections ont ensuite été contre-colorées en les plongeant une fois dans une solution d'hématoxyline (Sigma-Aldrich). Elles ont ensuite été lavées en les plongeant 10 fois dans de l'eau distillée, et déshydratées en les plongeant 10 fois dans de l'éthanol 95%, 10 fois dans de l'éthanol 100% et 10 fois dans du xylène. Les lames ont ensuite été montées en utilisant le milieu de montage Permount (ThermoFisher Scientific) et des lamelles couvre-objet (VWR). Les anticorps primaires utilisés pour les marquage par immunohistochimie sont: anti-GFAP 1: 1000 (Dako), anti-Pax6 1: 500 (Chemicon, Millipore).

Les observations ont été faites avec un microscope Leica DMRE (Leica Microsystems) et les images ont été acquises avec une caméra digitale Retiga EX (QImaging, Surrey, BC); avec le logiciel OpenLab, ver.3.1.1 (Open-Lab, Austin, TE).

5. PCR en temps réel

L'ARN des neurosphères (embryonnaires et adultes) en culture a été extrait avec le réactif Trizol (Invitrogen) selon le protocole fourni par le fabricant, et conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

Pour la transcription inverse (*reverse transcription*) en ADN complémentaire (ADNc), l'ARN a été dilué dans de l'eau distillée traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) jusqu'à un volume totale de $9\ \mu\text{L}$, et $1\ \mu\text{L}$ d'oligodT 12-18 ($1\ \mu\text{g}/\ \mu\text{L}$) (Invitrogen) a été ajouté. L'ARN a été ensuite dénaturé à 65°C pendant 10 minutes, mis sur glace pendant 5 minutes et centrifugé brièvement. La réaction de transcription inverse a été amorcée en ajoutant à chaque échantillon d'ARN $10\ \mu\text{L}$ de Master Mix constitué de $4\ \mu\text{L}$ de RT buffer 5x (Invitrogen), $3\ \mu\text{L}$ d'eau distillée DEPC, $1\ \mu\text{L}$ de DTT (dithiothréitol) $0,1\ \text{M}$ (Invitrogen), $1\ \mu\text{L}$ de dNTP $10\ \text{mM}$ (mélange équimolaire des désoxynucléotides triphosphates: dATP, dTTP, dGTP et dCTP, Sigma), $0,5\ \mu\text{L}$ de RNAGuard et $0,5\ \mu\text{L}$ de l'enzyme Transcriptase inverse, M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen), et en incubant à 37°C pendant 1 heure. Les tubes ont été mis sur glace, centrifugés brièvement et conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

La réaction d'amplification par PCR en temps réel comprend les composants suivants: $10\ \mu\text{L}$ d'eau distillée, $20\ \text{ng}$ des amorces sens et antisens, $1\ \mu\text{L}$ d'ADNc, $0,5\ \mu\text{L}$ du fluorophore de référence passive ROX (Invitrogen) dilué 1: 60 et $12,5\ \mu\text{L}$ de Platinum SYBRGreen SuperMix (Invitrogen) pour chaque échantillons en triplicata. Les temps et les températures de la réaction utilisés sont les suivants: 50°C 10 minutes, 95°C 10 secondes et 95°C 20 secondes et 60°C 35 secondes pour 60 cycles, suivi par la phase de dissociation où la température des échantillons est augmentée de $0,5\ ^{\circ}\text{C}$ chaque 10 secondes jusqu'à 95°C .

La réaction a été effectuée par un thermocycleur pour PCR en temps réel 7500 Real time PCR system (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) et les résultats ont été analysés avec le logiciel SDS v1.4 (Applied Biosystems).

Les séquences des amorces utilisées sont:

hprt

sens: 5'-ACTGTAATGATCAGTCAACGGG-3'

antisens: 5'-GGCCTGTATCCAACACTTGG-3';

p16^{Ink4a}

sens: 5'-CAACGCCCCGAACCTCTTTC-3'

antisens: 5'-GCAGAAGAGCTGCTACGTGAAC-3';

p19^{Arf}

sens: 5'-GGCTAGAGAGGATCTTGAGAAGAGG-3'

antisens: 5'-GCCCATCATCATCACCTGGTCCAGG-3';

p21^{Cip1}

sens: 5'-TGTCTTGCACTCTGGTGTCTG-3'

antisens: 5'-ATCTGCGCTTGGAGTGATAGA-3';

p27^{Kip1}

sens: 5'-TGAAGAACTAACCCGGGACTT-3'

antisens: 5'-TAGTAGAACTCGGGCAAGCTG-3';

p57^{Kip2}

sens: 5'-CGATACCTTCCCAGTGATAGC-3'

antisens: 5'-CATCCTGCTGGAAGTTGAAGT-3';

Bmi1

sens: 5'-GGAGACCAGCAAGTATTGTCCTATTTG -3'

antisens: 5'-CTTACGATGCCAGCAGCAATG-3'.

6. Analyses statistiques

Les données sont présentées en moyenne \pm écart type ou erreur standard, comme indiqué dans la légende des figures. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test t de Student.

Résultats

1. Rôle de Pax6 dans la génération des astrocytes pendant le développement embryonnaire

L'analyse du rôle de Pax6 dans la prolifération, la différenciation et l'acquisition de la compétence gliogénique des cellules souches neurales embryonnaires a été effectuée en utilisant un modèle murin mutant nul pour Pax6. Ces souris présentent la mutation Pax6^{LacZ}, qui cause la production d'une protéine non fonctionnelle²⁷⁸. Des souris mâles et femelles hétérozygotes pour Pax6 (Pax6^{LacZ/+}), qui présentent le typique phénotype *small eye*, ont été croisées ensemble pour générer des embryons homozygotes mutants pour Pax6 (Pax6^{LacZ/LacZ}), qui ont été utilisés pour les analyses décrites ci-dessous. Les souris homozygotes mutants ne sont pas viables après la naissance, elles ne peuvent donc être utilisées que pour des études au niveau embryonnaire. Puisque normalement les astrocytes commencent à être générés à partir du jour E17, dans la période finale de la gestation, les embryons ont été prélevés au jour E18,5, c'est-à-dire le dernier jour avant la naissance. Le contrôle est constitué par des embryons *wild-type* issus de la même portée que les mutants utilisés. Dans les prochaines sections, je présenterai les résultats préliminaires des expériences effectuées en utilisant ce modèle expérimental.

1.1 Pax6 contrôle la prolifération et la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches neurales embryonnaires

Afin d'analyser le rôle de Pax6 dans la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales embryonnaires (les cellules neuroépithéliales), des cultures de cellules

souches ont été effectuées à partir des lobes corticaux du cerveau des embryons *wild-type* et Pax6^{LacZ/LacZ} (indiqués à suivre comme "Pax6-/-") au jour E18,5. Ces cellules ont été inoculées en suspension unicellulaire dans un milieu contenant des facteurs promouvant la croissance des cellules souches (voir la section "Matériels et méthodes"). Le rôle de Pax6 a été évalué via l'essai de neurosphères. En effet, lorsque les cellules souches sont placées en suspension dans un milieu approprié, elles prolifèrent, et après quelques jours de culture forment des colonies sphériques qui poussent elles aussi en suspension, appelées "neurosphères"³³². Le nombre de ces neurosphères est indicatif de la quantité de cellules souches inoculées à l'origine (et donc l'entité du pool de cellules souches) et la taille indique quand à elle la capacité proliférative des cellules souches présentes en culture. De plus, la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches peut être évaluée en effectuant des passages séquentiels de la culture, consistant dans la dissociation des colonies en suspension unicellulaire et la remise en culture de ces cellules.

La Figure 12 montre les résultats obtenus de l'essai des neurosphères conduit en effectuant cinq passages clonaux (c'est-à-dire en utilisant pour chaque passage une neurosphère unique de la culture, qui a été dissociée et ré-inoculée en suspension unicellulaire) à une semaine de distance l'un de l'autre. La Figure 12A présente le nombre de neurosphères qui se sont formées après chaque passage normalisé sur le nombre de cellules inoculées. Tel que montré en 12A, les neurosphères Pax6-/- sont plus nombreuses que les *wild-type*, et cette différence augmente au cours des passages: après 5 passages, il n'y a presque plus de neurosphères *wild-type* en culture, alors que les mutantes sont encore nombreuses. Ce résultat montre que la mutation de Pax6 augmente la fréquence des divisions prolifératives symétriques et la capacité d'auto-renouvellement, portant à l'expansion du pool de cellules souches³³³. À la Figure 12B, il est possible de voir que, pour chaque passage, les neurosphères mutantes sont plus grandes que les *wild-type*, ce qui pourrait s'expliquer de différentes manières: un plus grand nombre de progéniteurs proliférant, un cycle cellulaire plus court, une tendance réduite des cellules à sortir du cycle cellulaire où un taux d'apoptose réduit.

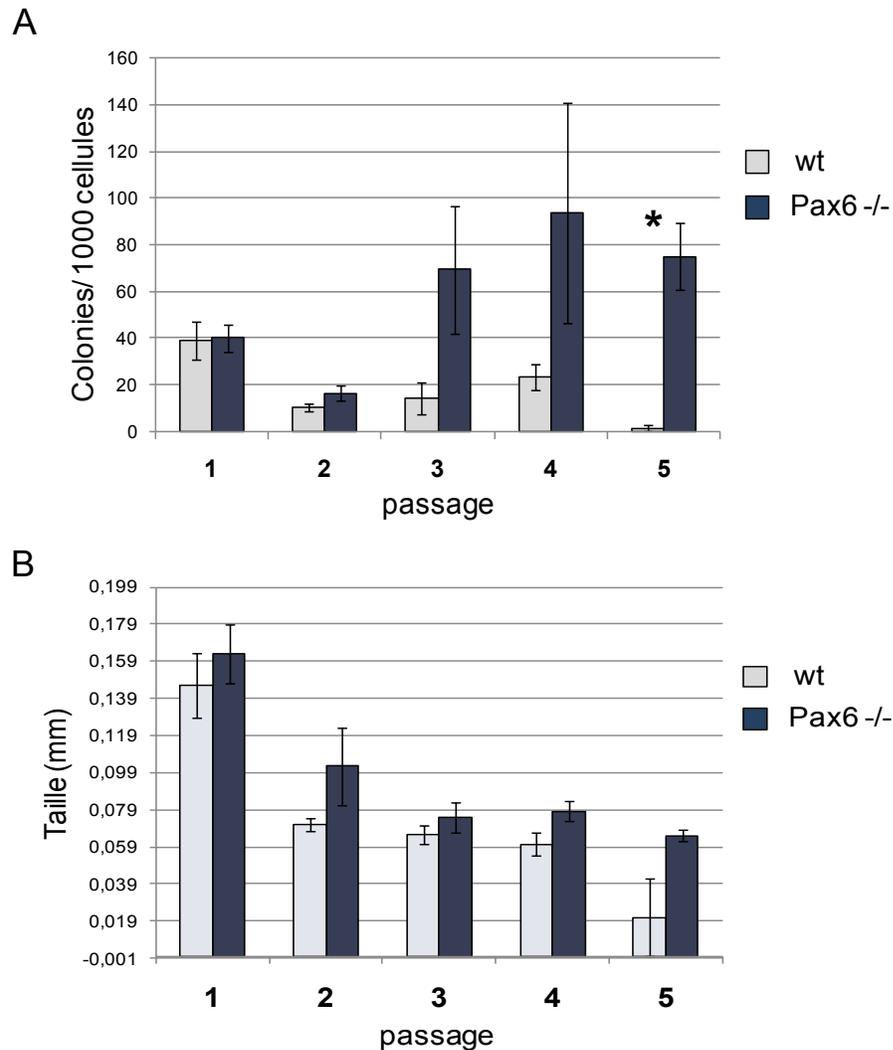


Figure 12: La suppression de Pax6 cause l'augmentation de la prolifération et de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches neurales embryonnaires.

Essai des neurosphères effectué à partir des cellules souches neurales embryonnaires isolées des lobes corticaux des embryons *wild-type* et Pax6^{-/-} au jour E18,5. Les neurosphères mutantes sont plus nombreuses (**A**) et plus grandes (**B**) que les *wild-type*, au cours des cinq passages effectués en utilisant l'essai de dissociation clonale. La figure A présente le nombre de neurosphères qui se sont formées après chaque passage par 1000 cellules inoculées. Les résultats sont représentés comme moyenne \pm erreur standard (*, $P < 0,05$).

Dans l'ensemble, ces résultats, qui sont en accord avec ceux obtenus par Duparc et al. effectués à partir de cellules souches rétiniennes⁴², montre que dans ce modèle Pax6 inhibe la prolifération et la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches neurales embryonnaires.

1.2 Les gènes régulateurs du cycle cellulaire sont sous-exprimés dans les neurosphères Pax6^{-/-}

Afin de comprendre les bases moléculaires de l'augmentation de la prolifération observée chez le mutant, l'ARN des neurosphères *wild-type* et Pax6^{-/-} a été analysé par PCR en temps réel pour déterminer le niveau d'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire qui sont impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules souches rétiniennes et des cellules souches neurales: p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf} et p21^{Cip1}^{42,334,335}. Les facteurs p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, p16^{Ink4a} et p21^{Cip1} inhibent la progression à travers le cycle cellulaire en inhibant les kinases cycline-dépendantes. p19^{Arf}, codé par le même locus que p16^{Ink4a}, inhibe Mdm2, et empêche ainsi la dégradation de la protéine p53 induite par Mdm2³³⁶. Nous avons également voulu analyser l'expression du facteur polycomb Bmi1, qui réprime p16^{Ink4a} et p19^{Arf} dans les cellules souches neurales cérébrales et rétiniennes^{337,338}. La Figure 13 compare le niveau d'expression de ces gènes dans les neurosphères dérivées de la culture des cellules souches embryonnaire du cerveau d'un embryon Pax6^{-/-} au jour E18,5 au niveau d'expression dans les neurosphères *wild-type* (dont l'expression est représenté étant égale à 1). Dans les neurosphères Pax6^{-/-} le niveau d'expression de p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf}, p21^{Cip1} est plus bas que le niveau d'expression de ces mêmes gènes chez le *wild-type*, alors que le niveau de Bmi1 ne change pas, en accord avec les résultats de Duparc et al.⁴² obtenus avec les cellules souches rétiniennes.

Ces résultats suggèrent que Pax6 est requis pour l'expression correcte de p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf} et p21^{Cip1} dans les cellules souches neurales, ce qui permet de supposer que le contrôle de l'expression de ces gènes contribue à ses effets sur la prolifération des ces cellules.

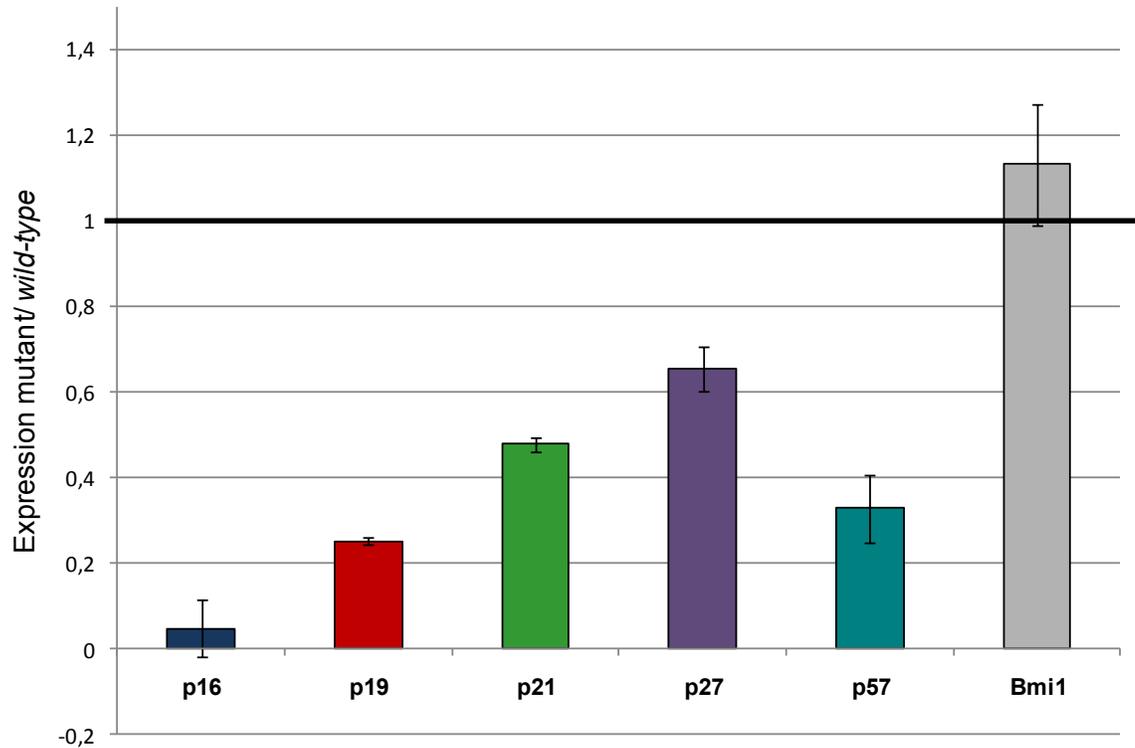


Figure 13: Niveau d'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire dans les neurosphères Pax6^{-/-}.

Résultats de l'analyse effectuée par PCR en temps réel sur l'ARN des neurosphères *wild-type* et mutantes nulles pour Pax6. Les neurosphères, dérivant de la culture de cellules souches neurales du cerveau à E18,5, ont été récoltées après trois passages. Le niveau d'expression dans les neurosphères mutantes est montré par rapport à l'expression dans les neurosphères *wild-type* (les valeurs pour les différents gènes ont été normalisées sur le niveau d'expression du gène *house-keeping* HPRT). Les gènes p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf} et p21^{Cip1} sont moins exprimés dans les sphères mutantes, alors que le niveau de

Bmi1 ne change pas. Les barres représentent les moyennes \pm écart-type des valeurs de trois triplicatas pour chaque échantillon.

1.3 Pax6 promeut la différenciation astrocytaire des cellules souches neurales embryonnaires

Afin d'évaluer le rôle de Pax6 dans la différenciation des cellules souches neurales embryonnaires en astrocytes, les protéines totales des neurosphères *wild-type* et mutantes pour Pax6 ont été extraites et analysées par Western Blot, pour estimer l'expression de la nestine qui est un marqueur des cellules souches neurales²⁷, et de GFAP qui est un marqueur de la différenciation astrogliale⁶³. La nestine est exprimée par les cellules neuroépithéliales du système nerveux central en développement et par les cellules de la glie radiale, qui sont les progéniteurs des neurones et des cellules gliales^{27,28}. Plusieurs études montrent que GFAP chez la souris est exprimé par les astrocytes, mais ne l'est pas par la glie radiale^{20,63,65} et est considéré comme un marqueur spécifique de la différenciation astrogliale.

Les neurosphères utilisées sont issues de la culture de cellules souches neurales du cerveau isolées à E18,5, et ont été récoltées après 3 passages. Comme montré dans la Figure 14, les neurosphères Pax6^{-/-} expriment 28 fois plus de nestine que les *wild-type* (qui expriment la nestine à un niveau qui n'est pas détectable par le Western Blot effectué). Par contre, les neurosphères mutantes expriment un plus bas niveau de GFAP comparé au *wild-type*, indiquant qu'elles contiennent une plus petite fraction de progéniteurs astrogliales. Ces résultats montrent que les neurosphères Pax6^{-/-} contiennent une plus grande fraction de cellules souches indifférenciées comparé aux *wild-type*, et une plus petite fraction de progéniteurs astrocytaires, suggérant qu'au stade du développement embryonnaire analysé, Pax6 promeut la maturation des cellules souches neurales et leur différenciation en astrocytes.

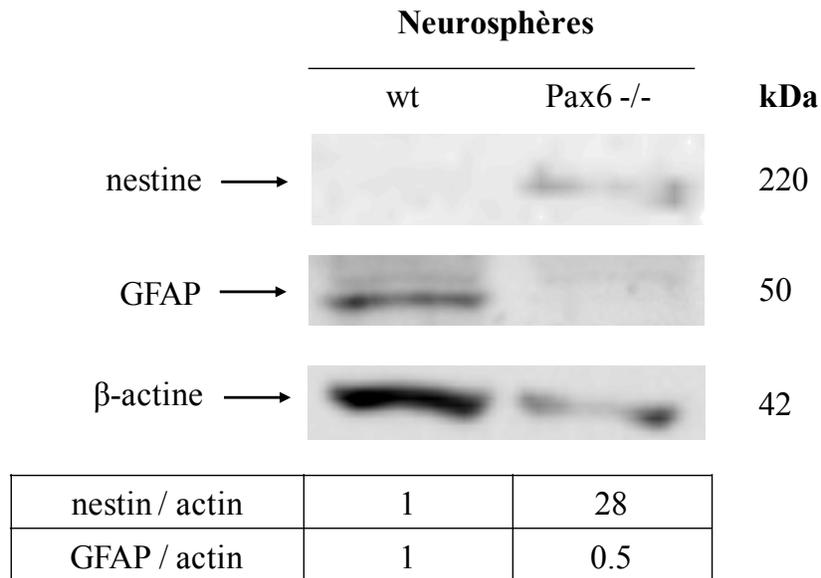


Figure 14: Pax6 promeut la différenciation astrocytaire des cellules souches neurales embryonnaires.

Western Blot effectué sur les extraits protéiques des neurosphères *wild-type* et Pax6^{-/-}. Les neurosphères, dérivant de la culture de cellules souches neurales du cerveau à E18,5, ont été récoltées après trois passages. Les neurosphères mutantes pour Pax6 expriment un niveau plus élevé de nestine et un niveau moins élevé de GFAP, suggérant que Pax6 promeut la maturation des cellules souches neurales et leur différenciation en astrocytes. Les niveaux d'expression de la nestine et de GFAP ont été normalisés par le niveau d'expression de la β-actine.

1.4 Pax6 est requis pour la différenciation des astrocytes dans la moëlle épinière

Nous avons ensuite voulu analyser l'effet de la mutation nulle de Pax6 sur la différenciation des astrocytes *in vivo*. La mutation Pax6^{LacZ/LacZ} est létale: les souris homozygotes n'ont pas d'œil ni de bulbe olfactif, sont incapables de respirer et meurent quelques minutes après leur naissance²⁷⁸: puisque la génération des astrocytes dans le cerveau commence peu de temps avant la naissance, et continue dans les premiers jours du développement post-natal (ils sont produits à partir du jour E17, avec un sommet de production entre les premiers deux jours postnataux, jusqu'à la deuxième semaine de vie⁹³), ces souris ne peuvent pas être utilisées pour étudier le rôle de Pax6 dans la différenciation des astrocytes cérébraux. Nous avons donc effectué l'analyse de la moëlle épinière, où la production des astrocytes commence plus précocement (la différenciation des cellules de la glie radiale en astrocytes commence à E16/17 par la production de progéniteurs astrocytaires immatures et les premiers astrocytes matures sont présents au jour E18^{319,339-341}).

Des sections coronales de la moëlle épinière des embryons *wild-type* et mutant au jour E18,5 ont été analysées par immunofluorescence avec le marqueur de différenciation astrocytaire GFAP (Figure 15). Comme montré dans la figure, le niveau d'expression et la quantité de cellules positives dans la moëlle épinière mutante sont fortement diminués comparé au *wild-type*, suggérant que Pax6 joue un rôle dans la différenciation des astrocytes dans la moëlle épinière. Ce résultat est cohérent avec celui de l'étude de Sakurai et al., qui montre que la moëlle épinière des souris mutantes nulles homozygotes Pax6^{Sey/Sey} à E16,5 présente un niveau d'expression de GFAP plus bas que le *wild-type*³¹⁹.

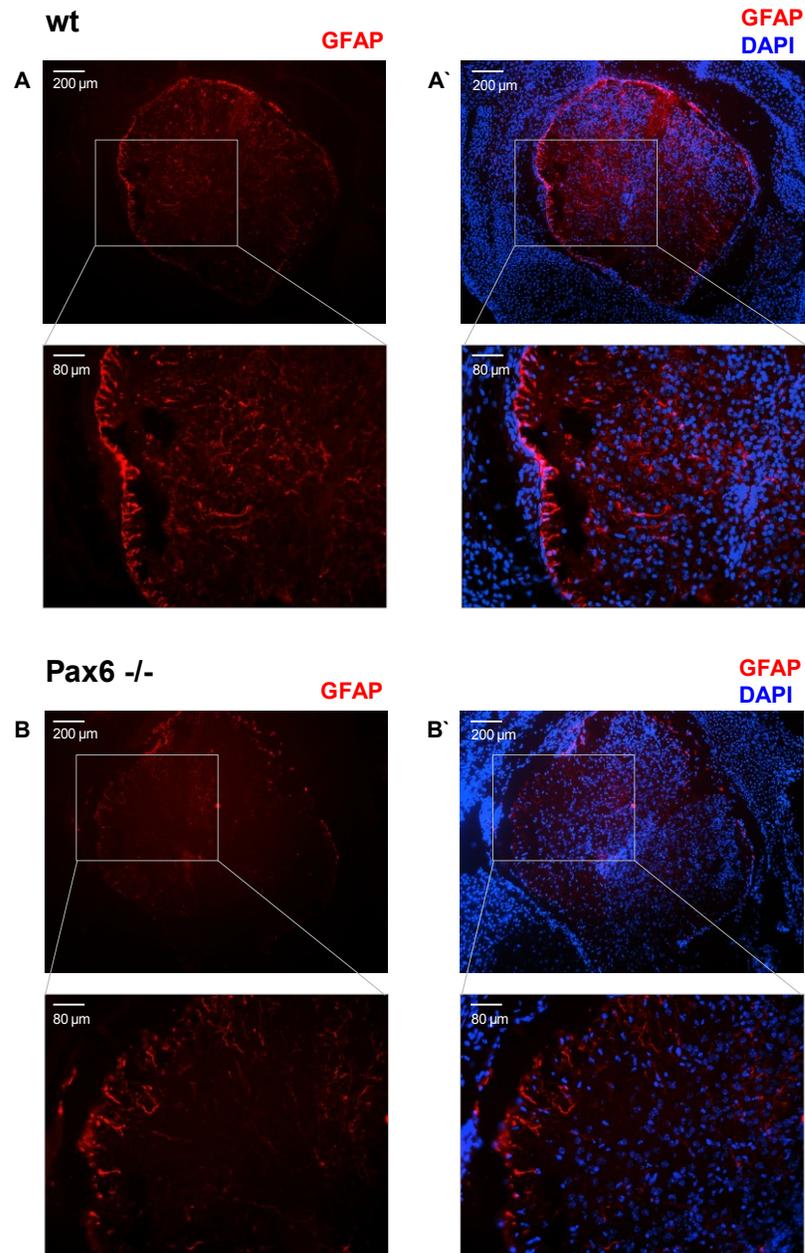


Figure 15: Pax6 est requis pour la différenciation des astrocytes dans la moëlle épinière.

Marquage par immunofluorescence pour GFAP de la moëlle épinière des embryons *wild-type* (A, A') et *Pax6*^{-/-} (B, B') au jour E18,5 (GFAP, rouge; DAPI, bleu). Le niveau d'expression de GFAP et la quantité de cellules positives dans la moëlle mutante sont inférieurs à ceux observés chez le *wild-type*.

2. Étude du rôle de Pax6 dans le développement post-natal des astrocytes *in vivo*

2.1 Description du modèle expérimental: la souris mutante conditionnelle hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox}

Afin d'analyser le rôle de Pax6 dans le développement des astrocytes *in vivo*, nous avons utilisé comme modèle expérimental une souris transgénique mutante conditionnelle chez laquelle l'inactivation de Pax6 est induite de façon spécifique dans les cellules exprimant GFAP, grâce au système de recombinaison CRE/ loxP. Ces souris sont viables, ne présentent pas d'anomalies anatomiques macroscopiques et se reproduisent, permettant de suivre le développement astrocytaire à l'âge post-natale et adulte.

Le système CRE/ loxP, développé par le Dr B. Sauer^{342,343}, est utile pour induire des modifications génétiques ou des délétions dans des cellules spécifiques d'intérêt³²⁹. La stratégie développée comprend la génération d'une souris transgénique qui exprime l'enzyme recombinase CRE du bacteriophage P1 sous le contrôle d'un promoteur cellule-spécifique³²⁹. La recombinase CRE cause la recombinaison spécifique, l'excision et la circularisation des séquences géniques flanquées par deux sites loxP en orientation directe³⁴³. Le croisement subséquent de cette souris transgénique avec une souris qui présente un allèle contenant une région critique flanquée par des sites loxP en orientation directe, cause l'excision et la circularisation de la séquence flanquée, spécifiquement dans les cellules exprimant le transgène CRE³⁴⁴.

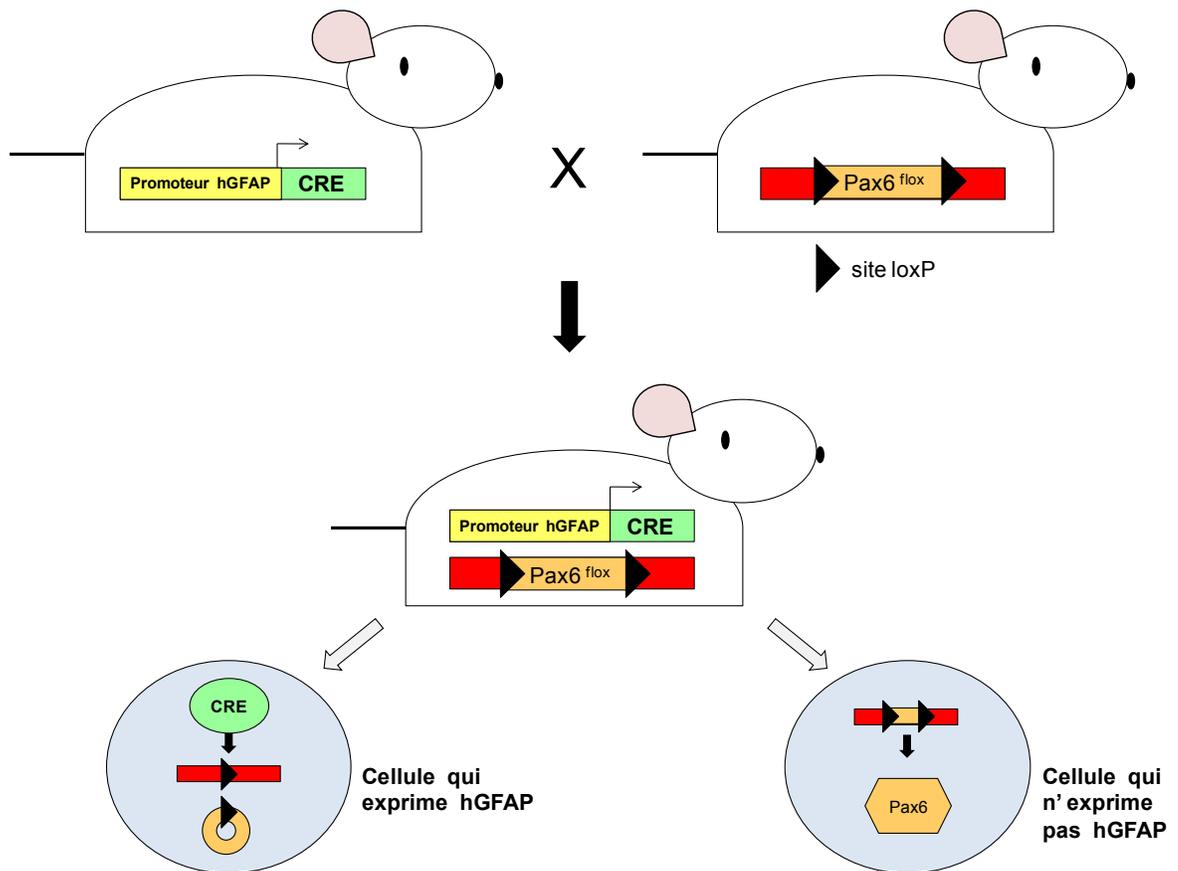


Figure 16: Génération des souris mutantes conditionnelles hGFAP-CRE /Pax6^{flox/flox}.

Représentation schématique de la stratégie utilisée pour produire les souris mutantes conditionnelles utilisées dans cette étude. Les souris transgéniques hGFAP-CRE³²⁹, exprimant la recombinaise CRE sous le contrôle du promoteur de GFAP humaine, ont été croisées avec les souris Pax6^{flox}³²⁶ (ayant une portion du gène Pax6 comprise entre deux sites loxP en orientation directe), pour obtenir des souris qui portent les deux modifications³²⁷ (hGFAP-CRE et les deux allèles Pax6^{flox}). Chez ces souris, la recombinaise CRE cause la recombinaison aux sites loxP et l'excision de la séquence flanquée par ces sites, ainsi provoquant l'inactivation de Pax6 dans les cellules qui expriment hGFAP (un seul allèle de Pax6 est montré pour simplicité). Par contre, dans les cellules qui n'expriment pas hGFAP la recombinaise CRE n'est pas produite et Pax6 n'est pas inactivé.

Pour obtenir les souris mutantes conditionnelles utilisées dans ce projet, nous avons croisé la souris transgénique hGFAP-CRE, qui exprime la recombinaise CRE sous le contrôle du promoteur du GFAP humaine³²⁹, avec la souris Pax6^{flox}, qui présente une partie du gène Pax6 flanquée par deux sites loxP en orientation directe³²⁶ (voir la section "Matériels et méthodes"). Les souris issues de ces accouplements qui présentent le transgène hGFAP-CRE et qui ont les deux allèles de Pax6 flanqués par les sites loxP (hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox})³²⁷ ont été utilisées dans notre étude. Chez ces souris, la recombinaise CRE, exprimée spécifiquement dans les cellules qui expriment hGFAP, induit dans ces cellules la recombinaison site-spécifique au niveau des sites loxP, causant ainsi l'excision de la portion de la séquence de Pax6 comprise entre les deux sites et l'inactivation de ce gène (Figure 16). Comme contrôles pour nos expériences, nous avons utilisés des souris *wild-type* ou exprimant la seule recombinaise (hGFAP-CRE/ Pax6^{+/+}) issues de la même portée que les doubles mutantes hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox}.

Le promoteur hGFAP a été originairement employé dans le contexte de la stratégie CRE/ loxP pour induire des modifications génétiques spécifiquement dans les astrocytes, qui expriment le gène GFAP³²⁹. GFAP (qui appartient à une famille de filaments intermédiaires incluant la vimentine, la nestine et autres, qui ont principalement des fonctions cyto-architecturales) est en effet considéré comme le marqueur prototypique pour l'identification des astrocytes⁹¹. La protéine GFAP endogène est exprimée chez les rongeurs à la fin du développement embryonnaire (chez la souris à partir du jour E17 dans les astrocytes et les cellules souches adultes^{20,63,65}), alors que chez les primates, l'expression de GFAP commence plus précocement, et a été observée dans les cellules de la glie radiale, qui sont les progéniteurs communs des neurones et des cellules gliales⁶². En fait, le groupe qui a conçu et produit les souris transgéniques hGFAP-CRE, à travers une étude de cartographie de destinée cellulaire (effectuée en croisant la souris hGFAP-CRE avec des lignées où le transgène lacZ est inséré de façon que son expression exige l'excision d'une séquence de stop flanquée par les sites loxP^{345,346}), a démontré que hGFAP n'induit pas l'expression de l'enzyme CRE, et la subséquente recombinaison des sites loxP, seulement dans les astrocytes, mais dans un spectre plus vaste de cellules comprenant certains types de neurones, d'oligodendrocytes et de cellules épendymaires³²⁹. La recombinaison se

produit donc également dans des cellules qui chez l'adulte n'expriment pas GFAP, mais qui dérivent des progéniteurs (les cellules de la glie radiale) qui expriment temporairement GFAP pendant le développement embryonnaire³²⁹. L'expression du transgène et la recombinaison induite par CRE, selon les études rapportées dans la littérature, commencent au jour E12,5/ E13,5 dans les cellules de la glie radiale du cortex (la partie dorsale du télencéphale), et s'étendent ensuite en direction medio-ventrale^{20,30,329,347}. Par contre, même si dans la région ventrale du télencéphale on observe des cellules qui présentent l'expression de CRE et la recombinaison à partir du jour E14,5, l'expression dans cette région est plus faible que dans le cortex, et même au jour E15,5/ E16,5 peu de cellules expriment le transgène et effectuent la recombinaison dans les éminences ganglionnaires³⁴⁷. Il a été démontré que les cellules exprimant hGFAP-CRE produisent seulement les neurones de projection corticale mais pas les neurones de la portion ventrale du télencéphale³⁰. Cela a été attribué à des différences intrinsèques spécifiques entre les cellules de la glie radiale dorsale et ventrale (par exemple, l'expression de Pax6, dont l'expression est limitée dans la région dorsale)³⁰. Par contre, une étude plus récente a expliqué le fait que les neurones ventraux ne dérivent pas des cellules de la glie radiale exprimant hGFAP-CRE de façon différente: il a été démontré que les cellules de la glie radiale ventrale commencent à exprimer hGFAP seulement après la fin de leur phase neurogénique, quand elles arrêtent de produire des neurones et commencent à produire les cellules gliales³⁴⁷. Par contre, les cellules de la glie radiale dorsales commencent à exprimer hGFAP plus précocement, pendant la phase neurogénique, et c'est pour cette raison qu'elles contribuent à la production des neurones corticaux³⁴⁷. Cette étude montre donc que l'activité du promoteur hGFAP n'est pas corrélée à l'apparition des cellules de la glie radiale (E12,5) dans toutes les régions du cerveau, mais seulement dans le cortex³⁴⁷. En fait, dans le télencéphale ventral, l'activité de hGFAP commence seulement quelques jours après la différenciation de la glie radiale dans cette région (comme démontré par la présence de cellules BLBP+ GLAST+ avant l'expression de hGFAP), quand ces cellules ont perdu leur capacité neurogénique et sont devenues uniquement gliogéniques³⁴⁷.

hGFAP-CRE est donc exprimée dans les progéniteurs des astrocytes et, tout en prenant en considération le fait que la recombinaison se produit également dans certaines classes de

neurones produites à partir de ces mêmes progéniteurs, le modèle hGFAP-CRE/Pax6^{flox} est un bon outil pour étudier l'effet de l'inactivation de Pax6 sur le développement des astrocytes et pour analyser le rôle de ce gène dans ce processus.

2.2 Étude du rôle de Pax6 dans la génération des astrocytes parenchymateux et des cellules souches neurales adultes du cortex cérébral

Afin d'évaluer l'effet de l'inactivation de Pax6 dans les progéniteurs des astrocytes sur la production et la différenciation des astrocytes corticaux *in vivo*, nous avons analysé l'expression de Pax6 et de GFAP dans le cortex cérébral des souris mutantes conditionnelles adultes. Chez l'adulte, GFAP est exprimé dans les astrocytes parenchymateux du cortex et dans les cellules souches adultes de la ZSV. L'expression de ces gènes a été analysée dans des sections coronales du cortex de jeunes souris de 16 jours à l'aide d'un marquage en immunohistochimie (voir la section "Matériels et méthodes").

Tout d'abord, on a voulu analyser l'effet de la mutation conditionnelle de Pax6 sur son expression. La Figure 17 montre le marquage pour Pax6 dans les cerveaux d'une souris mutante conditionnelle et de deux contrôles, une *wild-type* et une souris qui exprime seulement la recombinaison CRE, toutes issues de la même portée. Nous avons observé chez les contrôles la présence de marquage au niveau de la ZSV seulement. Par contre, chez la souris mutante conditionnelle la même région ne présente pas de marquage. L'expression de Pax6 au niveau de la ZSV a été observée principalement dans les progéniteurs en prolifération active (les cellules de type C)³¹⁵ et dans les neuroblastes en migration (qui donnent origine aux interneurons du bulbe olfactif)^{315,316}, et ce facteur de transcription semble avoir un rôle dans la spécification du destin neuronal et dans la génération de classes spécifiques d'interneurones tels que les cellules périglomérulaires dopaminergiques^{315,316}. Les cellules de type C et les neuroblastes dérivent des cellules de

type B de la ZSV (les cellules souches neurales adultes, ou "astrocytes de la ZSV", qui présentent des caractéristiques moléculaires des astrocytes, comme l'expression de GFAP^{190,192,223})¹⁸⁴. Le manque d'expression de Pax6 dans la ZSV des souris mutantes conditionnelles hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox} permet la formulation de trois hypothèses alternatives: 1) la mutation conditionnelle de Pax6 dans les progéniteurs pendant le développement embryonnaire empêche la génération des cellules souches neurales adultes, et de leurs cellules filles (cellules de type C et neuroblastes), qui sont donc absentes dans le cerveau adulte, ce qui expliquerait le manque de marquage dans le mutant, ou, 2) Pax6 n'est pas requis pour la génération des cellules souches neurales adultes, qui sont donc présentes dans la ZSV de la souris mutante. Cependant, étant donné que ces cellules expriment GFAP, la recombinaison CRE a induit la recombinaison et l'inactivation du gène Pax6, qui n'est par conséquent pas exprimé par ces cellules et par leurs descendantes, les cellules proliférant de type C et les neuroblastes, ou 3) les cellules souches neurales adultes sont générées dans le mutant mais l'absence de Pax6, due à l'action de la CRE recombinaison, empêche la génération ou le maintien des cellules de type C et neuroblastes, qui sont donc absents dans le cerveau adulte, ce qui encore une fois expliquerait le manque de marquage dans le mutant. La dernière hypothèse semble par contre moins probable parce que des études ont démontré que l'inactivation de Pax6 dans les cellules souches neurales adultes ne réduit pas³¹⁵ ou ne réduit que partiellement³¹⁶ la quantité de neuroblastes produits dans la ZSV adulte.

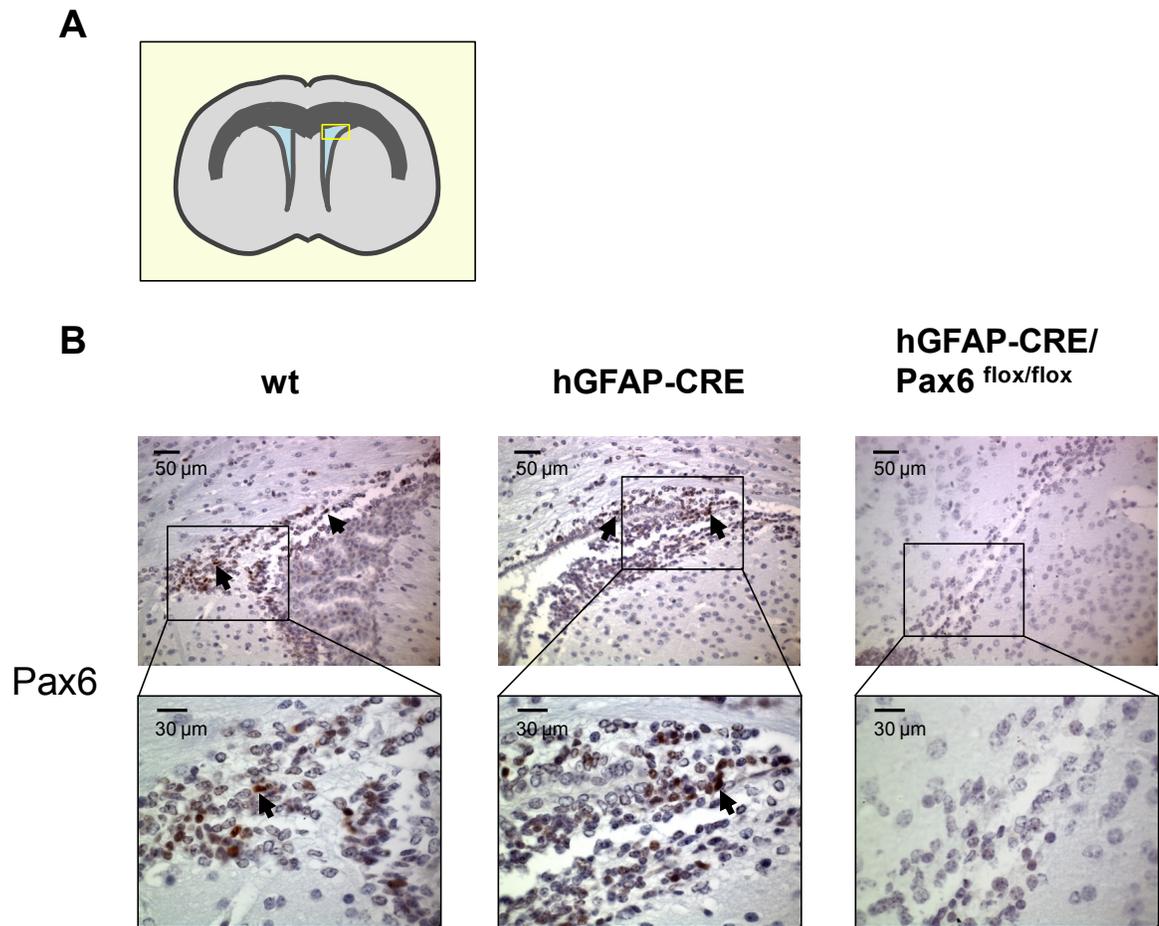


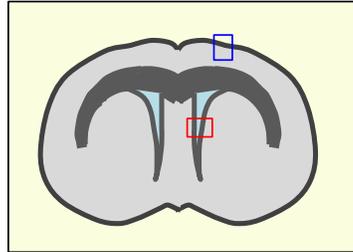
Figure 17: Les souris mutantes conditionnelles hGFAP-CRE/ Pax6^{flx/flx} n'expriment pas Pax6 dans la zone subventriculaire.

Marquage par immunohistochimie pour Pax6 dans la ZSV du cerveau de la souris mutante conditionnelle (hGFAP-CRE/ Pax6^{flx/flx}) et de deux contrôles (wt et hGFAP-CRE). **(A)** Représentation schématique d'une section sagittale du cerveau murin. Le rectangle jaune indique la région de la ZSV qui a été analysée. **(B)** Pax6 est exprimé dans la ZSV des contrôles (les flèches noires indiquent des cellules dont le noyau est positif pour le marquage), alors qu'il n'est pas exprimé chez le mutant.

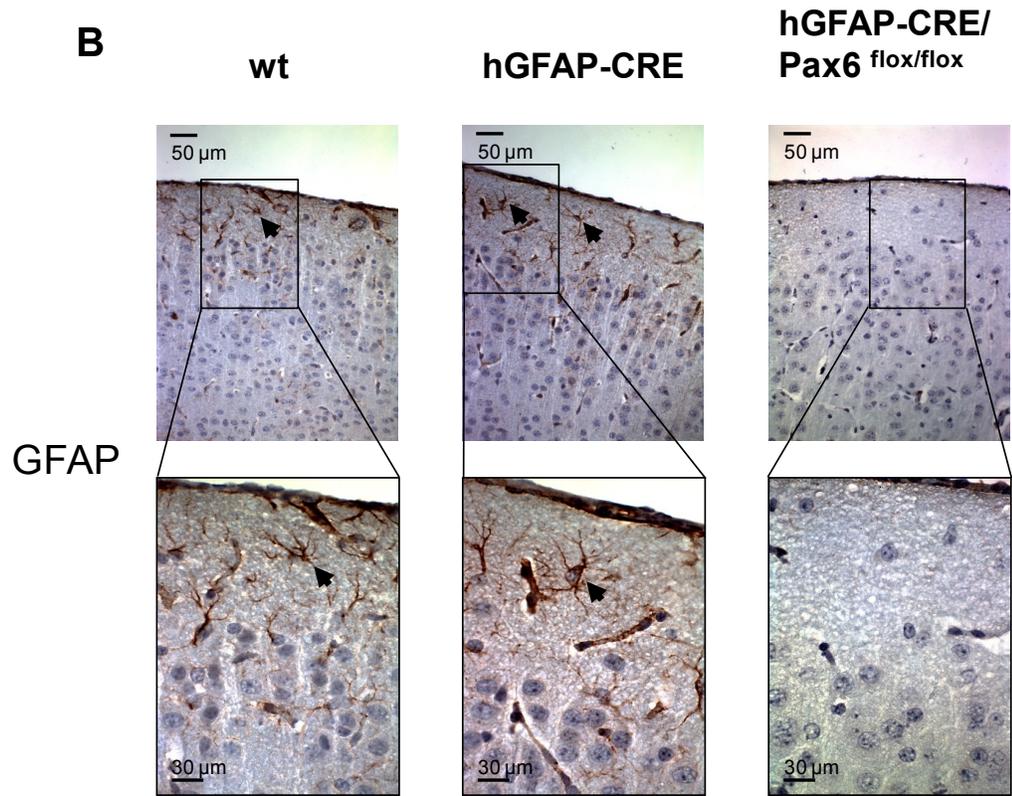
Afin de déterminer si les cellules souches neurales adultes sont ou non présentes dans le cerveau mutant, et d'analyser les effets de la mutation conditionnelle de Pax6 sur la différenciation des astrocytes parenchymateux du cortex, le marquage pour GFAP dans le cerveau du mutant et des deux contrôles a été effectué. La Figure 18 montre l'expression de GFAP dans le cortex (B) et dans la ZSV (C) du cerveau de la souris mutante et des contrôles. Comme illustré en B, le parenchyme du cortex cérébral des souris contrôles présente de nombreuses cellules qui ont le cytoplasme positif pour GFAP, et une structure étoilée caractérisée par de multiples prolongements multipolaires. Il s'agit des astrocytes parenchymateux matures du cortex cérébral. Par contre, dans le parenchyme du cortex de la souris mutante conditionnelle il n'y a pas de cellules positives pour GFAP, suggérant que Pax6 joue un rôle dans la différenciation de ces cellules.

La Figure 18C montre l'expression de GFAP dans la ZSV sur les mêmes sections de cerveau: dans cette région, contrairement au parenchyme cortical, on observe des cellules positives pour GFAP pour les trois génotypes analysés. Dans la ZSV, à l'âge adulte, GFAP est exprimé par les cellules souches neurales adultes (astrocytes de la ZSV)^{190,192,223}, qui dérivent de la glie radiale²⁰². Le fait que ces cellules soient présentes dans la ZSV du mutant suggère que Pax6 ne soit pas requis pour leur génération. Le manque d'expression de Pax6 dans la ZSV du mutant est donc attribuable à la recombinaison et à l'inactivation du gène induit par la recombinaison CRE dans les cellules souches neurales adultes, et à l'absence conséquente d'expression de Pax6 dans les cellules de type C et dans les neuroblastes.

A



B



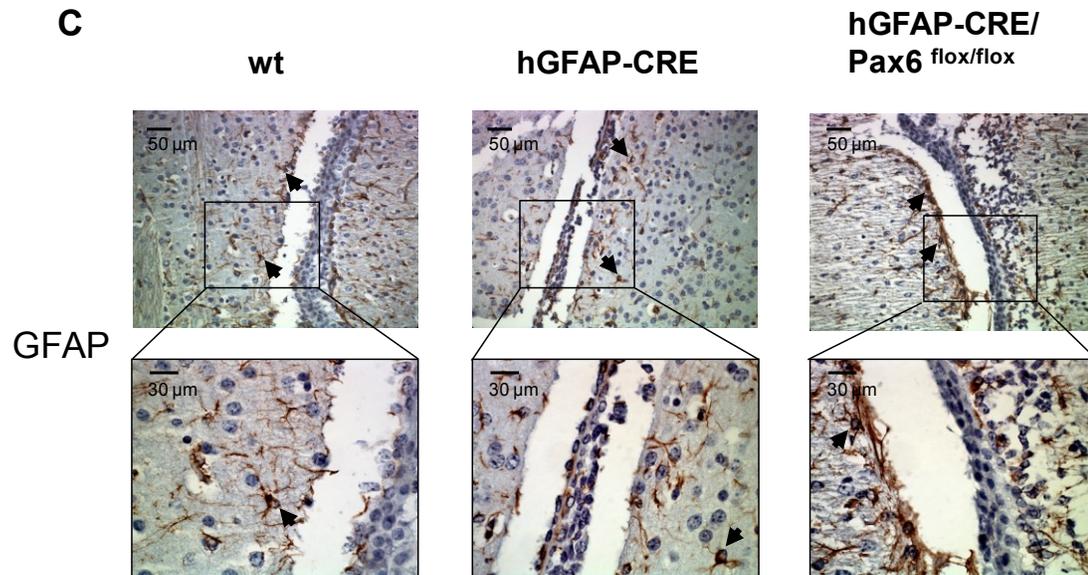
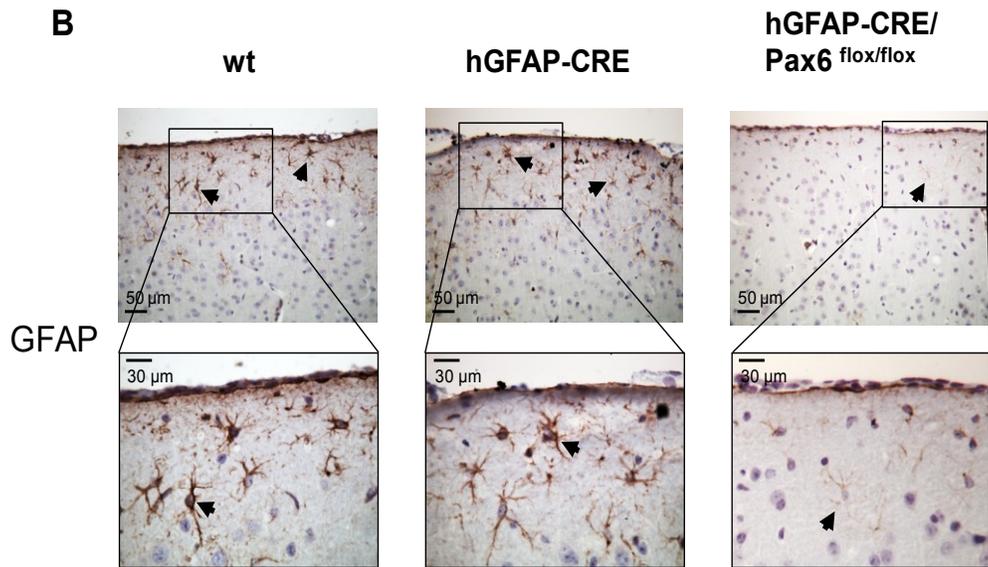
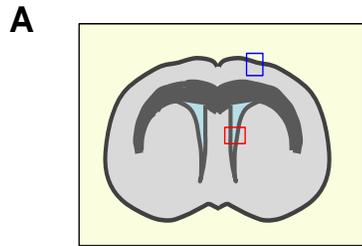


Figure 18: Pax6 est requis pour la différenciation des astrocytes parenchymateux mais ne l'est pas pour la génération des cellules souches neurales adultes dans le cortex cérébral.

Marquage par immunohistochimie pour GFAP dans le cortex cérébral et dans la ZSV du cerveau de la souris mutante conditionnelle (hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox}) et de deux contrôles (wt et hGFAP-CRE). (A) Représentation schématique d'une section sagittale du cerveau murin. Les rectangles rouge et bleu indiquent respectivement les régions de la ZSV et du cortex qui ont été analysées. (B) Le cortex des deux souris contrôles présente de nombreux astrocytes positifs pour GFAP, alors qu'ils sont absents chez le mutant, suggérant que Pax6 joue un rôle dans la différenciation de ces cellules. Par contre, dans la ZSV (C), on observe des cellules positives pour GFAP pour les trois génotypes analysés, correspondant aux cellules souches neurales adultes, suggérant que Pax6 n'est pas requis pour leur génération.



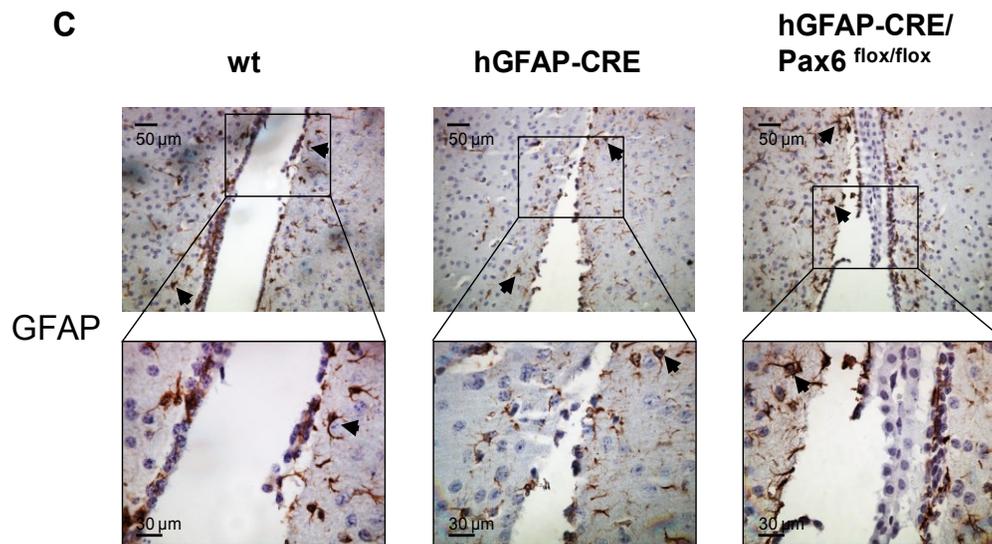


Figure 19: Le cortex des souris hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox} présente des astrocytes immatures à l'âge adulte.

Marquage par immunohistochimie pour GFAP dans le cortex cérébral et dans la ZSV du cerveau de la souris mutante conditionnelle (hGFAP-CRE /Pax6^{flox/flox}) et de deux contrôles (wt et hGFAP-CRE) âgés de 90 jours. **(A)** Représentation schématique d'une section sagittale du cerveau murin. Les rectangles rouge et bleu indiquent respectivement les régions de la ZSV et du cortex qui ont été analysées. **(B)** Les cortex des deux souris de contrôle présentent de nombreux astrocytes matures fortement positifs pour GFAP, alors que le cortex de la souris mutante présente très peu d'astrocytes immatures ayant une très faible expression de GFAP comparé aux contrôles, suggérant que Pax6 joue un rôle dans la différenciation de ces cellules. La ZSV **(C)** des trois génotypes analysés présente des cellules positives pour GFAP avec un niveau d'expression comparable, correspondant aux cellules souches neurales adultes.

Nous avons ensuite effectué les mêmes analyses sur le cerveau de souris plus âgées, afin d'évaluer *in vivo* les effets à long terme de la mutation de Pax6 et de clarifier son rôle dans le développement des astrocytes. Nous avons donc analysé par immunohistochimie l'expression de GFAP dans le cerveau de souris de 90 jours. La Figure 19B montre que, comme chez les souris plus jeunes, le cortex cérébral des souris contrôles (une souris Pax6^{flox/+}, considérée comme *wild-type*, et une souris hGFAP-CRE, issue de la même portée que la mutante) présente de nombreux astrocytes parenchymateux positifs pour GFAP (Figure 19B). Par contre, contrairement à ce qui est retrouvé chez la souris plus jeune, dans le cerveau du mutant hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox} de 90 jours on observe la présence de cellules étoilées positives pour GFAP, mais en très faible quantité et avec un niveau d'expression exigü comparé aux contrôles. Ces cellules semblent être des astrocytes immatures dont la différenciation n'est pas arrivée à terme. La présence de ces astrocytes immatures dans le cerveau de la souris mutante adulte indique qu'en absence de Pax6, le processus de différenciation et de maturation des astrocytes est compromis et ralenti. Ce résultat suggère donc que Pax6 promeut la différenciation et la maturation des astrocytes.

Concernant la ZSV (Figure 19C), comme observé chez les souris plus jeunes, dans cette région les trois génotypes analysés présentent des cellules positives pour GFAP avec un niveau d'expression comparable, correspondant aux cellules souches neurales adultes.

2.3 Rôle de Pax6 dans la génération des astrocytes et des cellules de Müller de la rétine

À la lumière du rôle de Pax6 dans la génération des astrocytes du cortex cérébral, nous avons voulu analyser l'effet de la mutation conditionnelle de ce gène dans la génération des cellules astrogliales d'une autre région du système nerveux central, la rétine. La rétine comprend deux types de cellules astrogliales, les cellules de Müller³⁴⁸ et les astrocytes^{349,350}. Les cellules de Müller sont des cellules bipolaires radiales qui traversent

l'épaisseur entière de la rétine et dont le noyau est situé dans la couche nucléaire interne. Ces cellules sont distribuées de façon homogène dans la rétine et projettent leurs prolongements dans les deux directions, vers la membrane limitante externe et vers la membrane limitante interne. Les prolongements s'insinuent entre les corps cellulaires des neurones dans les couches nucléaires et enveloppent des groupes de prolongements neuronaux dans les couches plexiformes. Les cellules de Müller sont produites par les progéniteurs neuroépithéliaux rétiniens¹⁶.

Les astrocytes ont une forme étoilée et se trouvent dans la couche des cellules ganglionnaires et dans la couche des fibres nerveuses, où leurs prolongements sont disposés parallèlement et entre les faisceaux de fibres nerveuses³⁵⁰. Le nombre d'astrocytes est proportionnel à l'épaisseur de la couche des fibres nerveuses. Ils sont distribués en correspondance avec des vaisseaux sanguins qui vascularisent la rétine^{349,351}. Les astrocytes rétiniens dérivent de progéniteurs cérébraux qui migrent dans la rétine à travers le nerf optique³⁵².

Pour déterminer si Pax6 joue un rôle dans la génération des cellules astrogliales rétiniennes, un marquage par immunohistochimie pour GFAP dans la rétine des souris mutante et contrôles de 16 jours a été effectué (Figure 20). La rétine des souris contrôles *wild-type* et hGFAP-CRE présente un faible marquage dans la couche nucléaire interne et dans la couche plexiforme externe, correspondant aux prolongements radiaux des cellules de Müller (les prolongements sont plus évidents sur toute l'épaisseur de la rétine chez la souris hGFAP-CRE) et un marquage évident dans les couches des cellules ganglionnaires et des fibres nerveuses, en correspondance des astrocytes. La rétine de la souris mutante hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox} présente un marquage beaucoup plus faible dans les couches nucléaire interne et plexiforme externe comparativement aux contrôles, et présente quelques cellules très faiblement marquées dans les couches des fibres nerveuses et des cellules ganglionnaires, suggérant que Pax6 joue un rôle dans la différenciation des cellules astrogliales rétiniennes.

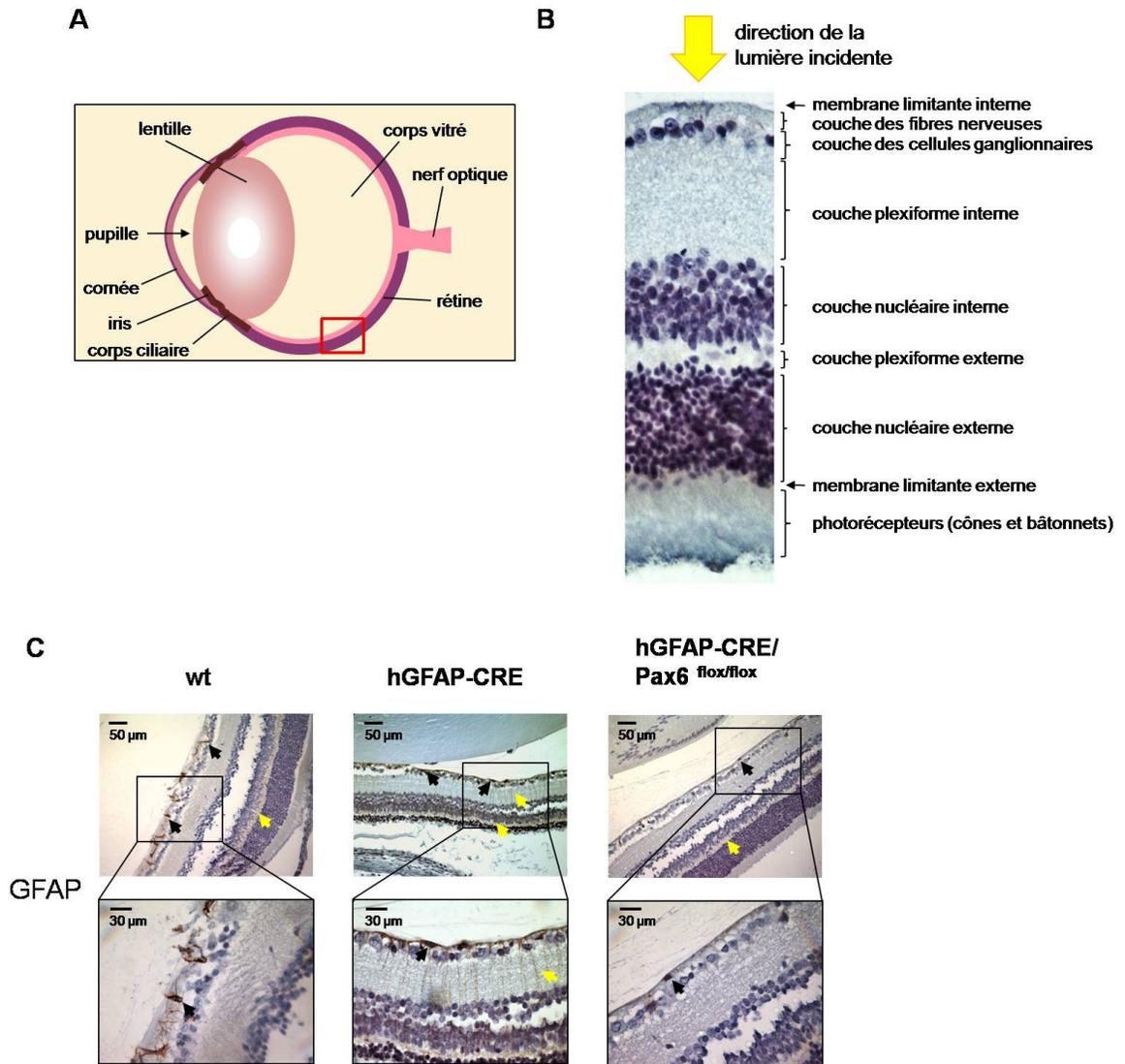


Figure 20: Pax6 promeut la différenciation des cellules de Müller et des astrocytes rétiniens.

(A) Représentation schématique d'une section sagittale de l'œil de souris. Le rectangle rouge montre la région qui a été analysée dans le cadre de notre étude. (B) Section histologique de la rétine de souris colorée à l'hématoxyline montrant les différentes couches rétiniennes. (C) Marquage par immunohistochimie pour GFAP de la rétine d'une souris mutante conditionnelle (hGFAP-CRE /Pax6^{flox/flox}) et de deux contrôles (wt et

hGFAP-CRE), âgées de 16 jours. Les rétines des souris contrôles *wild-type* et hGFAP-CRE présentent le marquage en correspondance des prolongements des cellules de Müller (flèches jaunes) dans la couche nucléaire interne et dans la couche plexiforme externe (chez la souris hGFAP-CRE, il est possible d'observer les prolongements traversant toute l'épaisseur de la rétine), et des astrocytes dans les couches des cellules ganglionnaires et des fibres nerveuses (flèches noires). Un marquage beaucoup plus faible avec très peu de cellules marquées est visible dans la rétine de la souris mutante conditionnelle, suggérant que Pax6 joue un rôle dans la différenciation des cellules gliales rétinienne.

Nous avons ensuite effectué le même marquage sur la rétine de souris plus âgées. Afin d'évaluer les effets à long terme de la mutation de Pax6 et de clarifier son rôle dans le développement des cellules de Müller et des astrocytes rétiens, on a analysé par immunohistochimie l'expression de GFAP dans la rétine de souris de 90 jours (Figure 21). On a utilisé deux souris contrôles (une souris Pax6^{flox/flox}, considérée comme *wild-type*, et une souris hGFAP-CRE) et une souris mutante conditionnelle hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox}. Comme dans le cas des souris de 16 jours, la couche des fibres nerveuses et la couche des cellules ganglionnaires des rétines des souris contrôles présentent des astrocytes marqués pour GFAP (flèches noires); la rétine de la souris mutante conditionnelle hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox} présente elle aussi de nombreux astrocytes positifs pour GFAP dans les mêmes régions, différemment des résultats observés chez la souris mutante plus jeune, qui ne présente qu'un faible marquage (Figure 21). Pour ce qui concerne les cellules de Müller, dans la rétine des souris contrôles, on observe un patron de marquage variable (flèches jaunes): la rétine Pax6^{flox/flox} présente un marquage plus concentré dans la couche plexiforme externe, alors que la rétine hGFAP-CRE a un marquage plus faible dans cette région mais présente des prolongements positifs dans la couche plexiforme interne. La rétine hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox} présente un marquage faible dans la couche plexiforme externe mais elle exhibe plusieurs prolongements positifs pour GFAP dans la couche nucléaire interne et dans la couche plexiforme interne. Ces résultats montrent donc qu'à l'âge de 90 jours, la rétine de la souris mutante conditionnelle possède des cellules astrogliales différenciées. En comparant les marquages effectués sur les rétines des souris de 16 et 90 jours, on peut donc observer que le défaut de maturation des cellules astrogliales observé chez le mutant plus jeune ne persiste pas à un âge plus avancé: l'absence de Pax6 dans les progéniteurs gliaux exprimant GFAP n'empêche pas la génération des cellules astrogliales dans la rétine, mais leur maturation est ralentie, suggérant ainsi que Pax6 joue un rôle dans le processus de différenciation et de maturation de ces cellules.

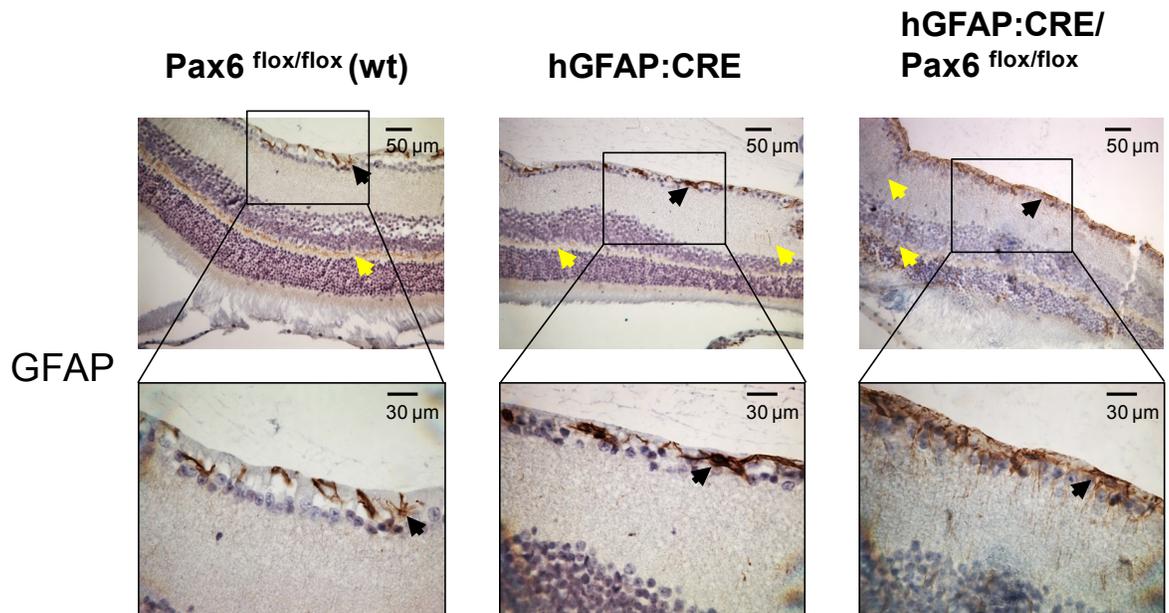


Figure 21: La rétine de la souris mutante conditionnelle hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox} présente des astrocytes et des cellules de Müller matures à l'âge de 90 jours.

Marquage par immunohistochimie pour GFAP de la rétine d'une souris mutante conditionnelle (hGFAP-CRE /Pax6^{flox/flox}) et de deux contrôles (Pax6^{flox/flox}, considéré comme *wild-type* et hGFAP-CRE), âgées de 90 jours. Les rétines des trois génotypes présentent des astrocytes positifs pour GFAP dans les couches des fibres nerveuses et des cellules ganglionnaires (flèches noires). Les trois génotypes présentent également des prolongements des cellules de Müller positifs pour GFAP (flèches jaunes).

Discussion

Pax6, un facteur de transcription hautement conservé parmi les vertébrés et les invertébrés²³⁹, est essentiel pour le développement embryonnaire de différents tissus^{239,255}. Il joue un rôle dans la régionalisation du système nerveux central^{283,299}, et régule la prolifération des cellules souches neurales et leur différenciation en neurones²⁸¹. Notre étude montre que Pax6 est impliqué dans le développement des astrocytes dans le système nerveux central. Nos résultats suggèrent que, dans la phase gliogénique du développement du système nerveux central, Pax6 contrôle la prolifération des cellules souches neurales embryonnaires et promeut leur différenciation en astrocytes. Nous montrons également que, lors du développement post-natal, Pax6 est requis pour la production des astrocytes et pour leur maturation.

1. Rôle de Pax6 lors de la différenciation astrocytaire des cellules souches neurales embryonnaires

Pax6 est exprimé dans les cellules de la glie radiale⁴⁰, les précurseurs communs des neurones et des astrocytes, et des études montrent qu'il est exprimé dans les astrocytes matures et dans les cellules souches neurales adultes de l'hippocampe, ayant une nature astrogliale³¹⁷⁻³¹⁹. Une étude conduite *in vitro* sur des cultures d'astrocytes effectuées à partir des cellules souches neurales embryonnaire et *in vivo* sur la moëlle épinière embryonnaire, utilisant comme modèle une souris mutante nulle pour Pax6, montre que ce gène semble avoir un rôle dans le contrôle de la prolifération et de la maturation des astrocytes³¹⁹. Pax6, gène essentiel dans le développement embryonnaire et dans la différenciation de plusieurs types cellulaires, est donc un candidat qui pourrait être impliqué dans la régulation de la différenciation des astrocytes du système nerveux central. Les premiers résultats suggérant

un possible rôle de Pax6 dans la production des astrocytes, proviennent d'observations effectuées dans notre laboratoire (Duparc R., non publiées), montrant que dans la rétine, qui est la partie nerveuse de l'œil, Pax6 pourrait avoir un rôle dans la production des cellules gliales: des expériences d'induction de la différenciation des cellules souches rétiniennes *wild-type* et mutantes nulles pour Pax6 *in vitro*, montrent en effet que les cellules mutantes présentent une réduction de la production de cellules GFAP+ et du potentiel gliogénique. Nous avons donc analysé le rôle de Pax6 dans la différenciation des cellules souches neurales embryonnaires en astrocytes dans le système nerveux central. A cette fin, nous avons utilisé un modèle animal constitué par la souris mutante nulle pour Pax6, présentant la mutation Pax6^{LacZ} 278, qui cause la production d'une forme tronquée inactive de la protéine. À travers des expériences effectués sur des cultures de cellules souches neurales isolées du cerveau des embryons au stade finale du développement embryonnaire, nous avons obtenu les résultats suivants: dans notre modèle expérimental Pax6 contrôle la prolifération et la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches neurales embryonnaires, et il promeut la différenciation des cellules souches neurales en astrocytes. Il faut préciser que les expériences effectuées en utilisant le mutant nul Pax6^{LacZ} sont préliminaires et permettent de définir une tendance concernant les fonctions de Pax6 dans les cellules souches neurales dans notre modèle, mais elles nécessiteront des approfondissements et des confirmations ultérieurs. Pour évaluer le rôle de Pax6 dans l'auto-renouvellement et dans la prolifération des cellules souches, nous avons effectué l'essai des neurosphères¹⁹⁵, qui est utilisé pour isoler les cellules souches et en analyser les propriétés et le potentiel de différenciation. Cet essai se base sur le fait que la prolifération des cellules souches peut être stimulée dans des conditions de culture appropriées, en présence de facteurs de croissance tels que EGF et FGF2. Dans ces conditions, les cellules prolifèrent et forment des agrégats sphériques non-adhérents, les neurosphères. Les cellules composant ces neurosphères peuvent être ultérieurement dissociées et remises en culture afin d'évaluer leur potentiel d'auto-renouvellement. Dans notre essai, les neurosphères mutantes homozygotes Pax6^{Lacz/LacZ} sont plus nombreuses et plus grosses lorsqu'elles sont comparées aux *wild-type*, suggérant qu'à cette phase du développement, Pax6 régule négativement la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches. Le rôle de Pax6

est hautement contexte et phase-dépendant, comme démontré par les multiples résultats présents dans la littérature concernant le rôle de Pax6 dans le maintien et dans la différenciation des cellules souches neurales embryonnaires^{40,42,46,281,303-307,309}. Plusieurs études montrent que Pax6 joue un rôle dans la régulation de la prolifération des cellules souches embryonnaires^{42,303-307,309}: Pax6 régule le cycle cellulaire et la progression de la division symétrique à la division asymétrique, et est impliqué dans le maintien du pool de cellules souches neurales et dans la neurogenèse. Récemment, Samson et al. ont réunis les résultats présents dans la littérature à travers une étude qui a amené à la génération d'un modèle d'action de Pax6³⁰⁵. Ils montrent que ce facteur fait partie d'un réseau moléculaire contrôlant la balance entre auto-renouvellement et différenciation, et que au cours des phases successives du développement, il promeut le maintien des cellules souches et la neurogenèse³⁰⁵. Nos résultats ont été obtenus à partir de cellules souches isolées du cerveau au dernier stade du développement embryonnaire, dans la phase gliogénique, ce qui pourrait expliquer le fait que dans notre modèle Pax6 semble inhiber la prolifération et l'auto-renouvellement en faveur de la différenciation. Nos résultats sont cohérents avec les résultats obtenus dans notre laboratoire concernant les fonctions de Pax6 dans les cellules souches neurales rétinienne: Duparc et al. ont montré que Pax6 contrôle la prolifération des progéniteurs neuroépithéliaux de la rétine⁴². Dans cette étude, les cellules mutantes pour Pax6 prolifèrent d'avantage que les *wild-type* puisqu'elles ont une tendance majeure à passer de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire et une moindre tendance à générer des divisions asymétriques et à sortir du cycle⁴². Comme dans le cortex cérébral, le rôle de Pax6 dans la régulation des cellules souches neurales rétiniennes est contexte-dépendant et peut dépendre de la phase développementale analysée, comme démontré par des études qui suggèrent que Pax6 joue un rôle dans le maintien et dans la prolifération de ces cellules^{304,306,307}.

Pour comprendre les bases moléculaires de l'effet de Pax6 sur la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches neurales, nous avons analysé l'effet de la mutation de ce gène sur l'expression de régulateurs du cycle cellulaire, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, p16^{Ink4a}, p19^{Arf} et p21^{Cip1}. Ces facteurs sont impliqués dans le contrôle de la prolifération des cellules

souches neurales rétiniennes et cérébrales à travers l'inhibition de la progression à travers le cycle cellulaire^{42,334,335}. Ils sont sous-exprimés dans les sphères mutantes comparativement aux *wild-type*, suggérant que l'effet observé de Pax6 sur la prolifération pourrait être médié par la régulation de ces molécules. Ce résultat est en accord avec celui de Duparc et al., qui montre une réduction de l'expression de ces gènes dans les cellules souches rétiniennes mutantes pour Pax6⁴². Par contre, comme démontré aussi pour la rétine dans l'étude de Duparc et al.⁴², la mutation de Pax6 ne semble pas avoir un effet sur l'expression de Bmi1, un facteur polycomb qui réprime p16^{Ink4a} et p19^{Arf} dans les cellules souches neurales cérébrales et rétiniennes^{337,338}.

L'analyse par Western Blot des extraits protéiques des neurosphères *wild-type* et mutantes montre que les neurosphères Pax6^{-/-} expriment un niveau plus élevé du marqueur des cellules souches nestine et un niveau plus bas du marqueur de différenciation astrocytaire GFAP. La nestine est un filament intermédiaire exprimé par les cellules neuroépithéliales²⁷ et par les cellules de la glie radiale²⁸, dont l'expression est perdue au cours de la différenciation. GFAP est un filament intermédiaire marqueur de la différenciation astrocytaire chez les rongeurs: alors que chez certaines espèces, comme les primates, l'expression de GFAP commence dans les cellules de la glie radiale⁶², plusieurs études montrent que, chez les rongeurs, son expression commence dans les astrocytes lors de leur différenciation durant les derniers jours du développement embryonnaire (E17 chez la souris)^{20,63,65}. Nos résultats suggèrent donc que Pax6 promeut la différenciation des cellules souches neurales embryonnaires en astrocytes.

Les astrocytes se forment dans le cerveau aux alentours de la naissance^{55,93}, et les souris mutantes nulles homozygotes meurent après la naissance à cause de graves défauts développementaux^{270,278}: il n'est donc pas possible d'étudier le développement des astrocytes matures dans le cerveau par l'intermédiaire de ce modèle. Par conséquent, la présence des astrocytes dans la moëlle épinière embryonnaire a été analysée à E18,5, où ces cellules sont produites plus précocement^{319,341}. La moëlle mutante montre un niveau d'expression de GFAP beaucoup moins élevé comparé au *wild-type*, soutenant un possible rôle de Pax6 dans la différenciation de ces cellules. Ces résultats sont en accord avec les

résultats présentés dans une étude de 2008 montrant que Pax6 inhibe la prolifération et promeut la maturation des astrocytes³¹⁹. Au contraire de notre étude, qui a été conduite à partir des cultures de cellules souches neurales, cette étude a été effectuée en utilisant des cultures d'astrocytes obtenues en plaçant les cellules du cortex cérébral embryonnaire de souris mutantes Pax6^{Sey/Sey} et *wild-type* en présence d'un milieu qui favorise la croissance des astrocytes. Les auteurs montrent que les astrocytes mutants prolifèrent plus et expriment un niveau plus élevé de nestine et de CD133 (un autre marqueur des cellules souches), et ont également un potentiel de migration plus haut comparativement aux *wild-type*³¹⁹. Dans leur modèle, la moëlle épinière mutante à E16,5 présente un niveau d'expression de GFAP plus bas que celui observé chez le *wild-type*. Nous avons obtenu le même résultat sur la moëlle à E18,5. Les auteurs de cette étude comparent le phénotype de leurs astrocytes mutants (prolifération aberrante, différenciation immature, et potentiel de migration élevé) à celui des cellules de gliome malin³¹⁹, cancer astrocytaire qui constitue la forme la plus courante et la plus agressive de tumeur cérébrale maligne causant un taux de mortalité très élevé¹⁵⁷. Ils suggèrent donc que la perte de la fonction de Pax6 pourrait être impliquée dans la genèse de ce cancer³¹⁹. Cette hypothèse est cohérente avec le fait que le niveau d'expression de Pax6 est réduit dans les échantillons de gliome humaine comparé au tissu sain, et inversement corrélé avec le grade de la tumeur, et qu'un bas niveau d'expression de Pax6 prédit un mauvais pronostic pour les patients atteints de gliome astrocytaire malin³²³. De plus, la surexpression de Pax6 supprime la croissance des cellules de glioblastome humain injectées chez la souris³²⁴. Nos résultats sont en accord avec ce qui émerge de l'ensemble de ces études.

2. Pax6 dans le développement post-natal des astrocytes

Les mutants nuls pour Pax6 meurent tôt après la naissance^{270,278}, ce qui ne permet pas d'utiliser ce modèle expérimental pour étudier les fonctions de ce gène lors du développement post-natal des astrocytes: à cette fin, nous avons donc utilisé un modèle

constitué par une souris mutante conditionnelle pour Pax6 à travers le système de recombinaison CRE/ loxP³²⁷. Nous avons croisé la lignée hGFAP-CRE³²⁹, exprimant la recombinaise CRE sous le contrôle d'un élément du promoteur de GFAP humaine, avec la lignée Pax6^{fllox}³²⁶, qui présente une séquence critique du gène Pax6 flanquée par deux sites loxP, pour obtenir les souris mutantes conditionnelles hGFAP-CRE/ Pax6^{fllox/fllox}³²⁷. Chez ces souris, Pax6 est inactivé dans les cellules exprimant hGFAP, dont l'expression la plus précoce est présente au jour E12,5/13,5 dans les cellules de la glie radiale^{20,30,33,329}. L'utilisation de ce modèle peut être utile pour étudier le rôle de Pax6 lors du développement post-natal des astrocytes. A cette fin, nous avons effectué des marquages en immunohistochimie avec des anticorps contre Pax6 et GFAP sur des sections de cerveaux de souris âgées de 16 jours. Nous avons observé que les souris *wild-type* et exprimant CRE utilisés comme contrôle expriment Pax6 dans la région subventriculaire, alors que les souris mutantes conditionnelles hGFAP-CRE /Pax6^{fllox/fllox} ne présentent pas de marquage dans cette même région. Dans la ZSV post-natale, Pax6 est normalement exprimé dans les cellules C en prolifération active³¹⁵ et dans les neuroblastes nouvellement générés^{315,316}, qui dérivent des cellules souches neurales adultes de la ZSV¹⁸⁴. Le marquage avec un anticorps contre GFAP dans la même région a révélé que les cellules souches adultes sont présentes dans la ZSV de la souris mutante, montrant ainsi que Pax6 n'est pas nécessaire pour leur génération. Par conséquent, le manque d'expression de Pax6 serait attribuable à la recombinaison et à l'inactivation de ce gène induites par la recombinaise CRE dans les cellules souches neurales adultes. Ceci pourrait expliquer l'absence d'expression de Pax6 dans les cellules de type C et dans les neuroblastes ou en alternative entraver la différenciation ou le maintien de ces deux types cellulaires. La deuxième possibilité est par contre considérée moins probable parce que des études ont montré que l'inactivation de Pax6 dans les cellules souches neurales adultes ne réduit pas³¹⁵ ou ne réduit que partiellement³¹⁶ la quantité de neuroblastes produits dans la ZSV adulte.

L'analyse de l'expression de GFAP permet également d'évaluer l'effet de la mutation de ce gène sur le développement des astrocytes corticaux: la souris mutante pour Pax6 ne présente pas d'astrocytes corticaux à l'âge de 16 jours, alors qu'un petit nombre

d'astrocytes immatures ayant une faible expression de GFAP comparé au *wild-type* est présent dans le cortex à l'âge de 90 jours, suggérant qu'en l'absence de Pax6 la maturation terminale de ces cellules est compromise. Un article publié en juillet 2009 par le groupe du Dr. A. Stoykova³²⁷, dans le contexte d'une analyse des anomalies des couches neuronales corticales causées par la mutation de Pax6, montre que les souris Emx1-CRE/ Pax6^{flox/flox}³⁵³ (des souris mutantes conditionnelles pour Pax6 spécifiquement dans le cortex), ne présentent pas d'astrocytes dans le cortex cérébral, ni à l'âge de 10 jours ni à l'âge adulte, mais présentent par contre plus d'oligodendrocytes³²⁷. Chez ces souris, l'inactivation de Pax6 dans les progéniteurs sous le contrôle du promoteur du gène Emx1 (un gène à homéodomaine exprimé dans les progéniteurs neuronaux et dans certains neurones matures dans le cortex) commence au jour E9,5³⁵³, beaucoup plus précocement par rapport au début de l'expression de hGFAP. Le fait qu'ils n'aient pas observé des astrocytes immatures dans le cerveau adulte du mutant pourrait être expliqué en faisant l'hypothèse que Pax6, dans une phase précoce, pourrait avoir une fonction essentielle dans la spécification du destin astrocytaire et que, dans une phase successive, il serait impliqué dans la maturation des précurseurs astrocytaires: dans notre modèle, l'inactivation de Pax6 intervient à E12,5/13,5^{20,30,33,329}, dans une phase où certains précurseurs pourraient déjà être spécifiés dans leur destin astrocytaire, ce qui expliquerait la présence d'astrocytes dans le cortex du mutant adulte. Par contre, l'absence de Pax6 à partir de ce stade pourrait compromettre la maturation complète de ces cellules, qui restent immatures.

Les précurseurs des astrocytes migrent de la ZSV jusqu'à leur destination finale dans le cortex, tout au long des prolongements des cellules de la glie radiale, qui, comme pour les précurseurs neuronaux, guident les précurseurs astrocytaires vers le cortex³⁵⁴. Le manque ou la forte réduction du nombre d'astrocytes dans le cortex des souris mutantes conditionnelles pour Pax6 pourrait être en partie dû à un défaut de migration. Cette hypothèse mérite des approfondissements ultérieurs, car le défaut de migration pourrait contribuer avec le défaut de maturation au phénotype observé. Pax6 joue d'ailleurs un rôle dans la régulation de la migration cellulaire pendant la régionalisation du télencéphale, probablement à cause de ses effets sur l'expression de molécules d'adhésion et sur la

synthèse de faisceaux de cellules gliales qui s'opposent physiquement à la migration²⁹¹. À travers des expériences de culture d'astrocytes à partir des lobes corticaux d'embryons mutants nuls pour Pax6, Sakurai et Osumi montrent que l'absence de Pax6 augmente la migration *in vitro* des astrocytes³¹⁹. L'étude de l'effet de Pax6 sur la migration *in vivo* dans un mutant conditionnel où ce gène est inactivé spécifiquement dans les précurseurs astrocytaires pourrait mieux élucider le rôle physiologique de Pax6 lors de ce processus.

Un élément important à considérer est que les cellules de la glie radiale en plus de générer les astrocytes, sont aussi les progéniteurs de la plupart des neurones. L'inactivation de Pax6 dans la glie radiale au jour E12,5/ E13,5 pourrait donc affecter la différenciation des neurones. L'étude du groupe du Dr. Stoykova montre que le cerveau des souris mutantes conditionnelles Emx1-CRE/ Pax6^{flox/flox}, où Pax6 est inactivé précocement dans les précurseurs corticaux, présentent des anomalies corticales relatives à des classes et couches neuronales spécifiques, qui causent également des déficits cognitifs et comportementaux chez les mutants³²⁷. Ils observent plus particulièrement l'expansion des neurones des couches inférieures (neurones infragranulaires) et de la zone marginale, et la réduction des neurones des couches supérieures (neurones supragranulaires). En ce qui concerne notre modèle, il a été démontré que les cellules exprimant hGFAP-CRE produisent les neurones de projection corticaux mais ne produisent pas les neurones de la portion ventrale du télencéphale (puisque les cellules de la glie radiale ventrale commencent à exprimer hGFAP seulement après la fin de leur phase neurogénique. En revanche, les cellules de la glie radiale dorsale commencent à exprimer hGFAP plus précocement, pendant la phase neurogénique)³⁴⁷. En utilisant les souris hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox}, le groupe du Dr Stoykova a observé que l'inactivation de Pax6, qui dans ce modèle est induite dans une phase tardive de la neurogenèse, après la génération des neurones des couches inférieures, ou neurones infragranulaires, n'affecte pas la spécification et le nombre des neurones des couches supérieures du cortex, ou neurones supragranulaires³²⁷. Ils rapportent que pendant la progression de la différenciation neuronale l'expression de Pax6 dans les progéniteurs neuronaux diminue fortement après E14,5³⁵⁵, et suggèrent donc que un bas niveau de Pax6 dans les progéniteurs neuronaux

tardifs ne joue pas un rôle important dans la spécification du destin neuronal infra- vs supra granulaire³²⁷. Dans un futur proche, il sera nécessaire d'approfondir les effets de la mutation de Pax6 sur la neurogenèse dans ce modèle. Afin d'éviter les effets de la mutation de Pax6 sur la génération des neurones, et d'obtenir un modèle de mutation conditionnelle spécifique dans les astrocytes, certains groupes ont utilisé des souris transgéniques où l'expression de CRE est sous le contrôle du promoteur du GFAP murin (mGFAP)^{356,357}. Cette approche a été utilisée parce que GFAP est exprimé plus tard chez la souris, dans les dernières phases du développement embryonnaire, et l'expression de ce gène est limitée aux astrocytes et à des petites populations neuronales dans le bulbe olfactif, l'hippocampe et le cortex. La régulation temporelle de l'expression génique peut être accomplie en utilisant des systèmes inductibles, comme les systèmes basés sur l'activation de l'expression induite par le tamoxifène, qui a été appliquée à des études sur les astrocytes en utilisant différents promoteurs, incluant hGFAP³⁵⁸, mGFAP et le transporteur astrocytaire du glutamate GLAST³⁵⁹. Par contre, dans ce modèle, la variabilité de l'efficacité entre les souris individuelles peut compliquer les comparaisons quantitatives⁹². Il ne faut pas oublier que tous les modèles qui utilisent le promoteur de GFAP (humain ou murin) pour activer l'expression de CRE, impliquent son expression dans les progéniteurs des niches neurogéniques adultes, qui expriment GFAP, et par conséquent la délétion de Pax6 dans ces cellules et dans leurs descendants.

Nous avons analysé l'expression de GFAP dans la rétine, afin d'évaluer la contribution de Pax6 dans la génération des cellules astrogliales d'une autre région du système nerveux central. Plusieurs études ont démontré que Pax6 est impliqué dans la régulation de la prolifération, de la multipotence et de la différenciation neuronales des cellules souches rétinienne^{18,42,304,306,307}. Les résultats de notre analyse montrent que la rétine de la souris hGFAP-CRE/ Pax6^{flox/flox} à l'âge de 16 jours présente un marquage beaucoup plus faible dans les couches nucléaire interne et plexiforme externe (en correspondance des prolongements des cellules de Müller) comparativement aux contrôles, et ne présente que très peu de cellules faiblement marquées comparativement aux contrôles dans les couches des fibres nerveuses et des cellules ganglionnaires (en correspondance des astrocytes

rétiniens). Par contre, à l'âge de 90 jours la rétine de la souris mutante exprime GFAP de façon comparable aux contrôles, montrant que le défaut de maturation des cellules astrogliales observé chez le mutant plus jeune ne persiste pas à un âge plus avancé. Nos résultats montrent donc que l'inactivation de Pax6 dans les progéniteurs exprimant GFAP induit un ralentissement de la différenciation des cellules astrogliales rétiniennes, suggérant que Pax6 joue un rôle dans ce processus. En alternative, concernant les astrocytes rétiniens, Pax6 pourrait jouer un rôle dans la migration des progéniteurs de ces cellules à travers le nerf optique jusqu'à leur destination finale dans la rétine. L'inactivation de Pax6 pourrait donc provoquer un ralentissement dans la migration, et cet effet, en association avec le défaut de maturation, pourrait contribuer à la réduction d'astrocytes observée dans la rétine des jeunes souris mutantes. Des approfondissements ultérieurs seront nécessaires pour évaluer cette possibilité.

3. Perspectives

Les effets de la mutation de Pax6 sur la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales embryonnaires montrés dans cette étude suggèrent que Pax6 joue un rôle dans la maturation de ces cellules et dans la différenciation astrocytaire. Ces résultats nécessitent des confirmations et des approfondissements afin de déterminer les voies de signalisation moléculaire impliquées. Des observations effectuées au sein de notre laboratoire montrent que Pax6 présente des séquences de liaison putatives sur le gène GFAP, suggérant une activation directe de ce gène. Le rôle de Pax6 lors du développement du système nerveux central est par contre très complexe, et dérive de l'interaction avec plusieurs facteurs de transcription²⁸¹, ce qui rend plus probable une activation de nature indirecte.

Le phénotype immature des cellules souches neurales embryonnaires et la réduction de la différenciation astrocytaire observés en l'absence de Pax6, en association avec les résultats présents dans la littérature montrant une relation entre l'expression de Pax6 et

l'inhibition de la croissance du gliome^{323,324}, permettent de suggérer des correspondances entre le phénotype observé et les cellules tumorales. Sakurai et al., dans le but de définir les voies de signalisation impliquées dans l'induction du phénotype des astrocytes mutants Pax6^{Sey/Sey} observé dans leur étude³¹⁹ (prolifération et migration aberrantes et différenciation immature, qui rappellent le phénotype des cellules cancéreuses), ont observé que les astrocytes mutants présentent l'augmentation de l'activité de pAkt³¹⁹. Akt est une molécule qui joue un rôle dans la suppression de l'apoptose et dans l'augmentation de la survie cellulaire, dont l'augmentation de l'activité est impliquée (en coopération avec d'autres altérations génétiques) dans la genèse du gliome^{360,361}. Concernant les cellules à l'origine des gliomes astrocytaires, les résultats actuels suggèrent que ces cellules pourraient être des astrocytes, des précurseurs gliaux ou des cellules souches¹⁵⁷. L'hypothèse actuellement la plus soutenue est que ces cancers soient établis par une petite population de cellules souches cancéreuses cérébrales (BTSCs, *brain tumor stem cells*)¹⁵⁹, mais la nature exacte de ces cellules n'a pas encore été définie. Pour déterminer si l'inactivation de Pax6 (qui n'est pas suffisante pour induire la transformation tumorale) peut contribuer au développement du cancer, il serait intéressant de coupler la mutation de ce gène avec la mutation d'un gène suppresseur de tumeur, par exemple p53, et analyser l'effet de la double mutation sur la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales embryonnaires. Pour étudier l'effet de l'inactivation de Pax6 *in vivo*, il faudrait ensuite produire des souris présentant la mutation nulle du suppresseur de tumeur et la mutation conditionnelle (par exemple avec le système CRE-loxP) de Pax6 dans les cellules souches neurales ou dans les cellules de la glie radiale, et évaluer la contribution de l'absence de Pax6 dans la formation de masses tumorales cérébrales.

Concernant le rôle de Pax6 dans le développement des cellules astrogliales cérébrales, suggéré par le phénotype des souris mutantes conditionnelles hGFAP-CRE/ Pax6^{flx/flx} observé dans notre étude, il serait avant tout nécessaire de confirmer l'hypothèse que Pax6 joue un rôle dans la maturation des astrocytes corticaux en effectuant des marquages du cerveau des souris mutantes conditionnelles adultes avec des anticorps spécifiques pour différentes étapes différenciatives de ces cellules (glie radiale, ex. BLBP, ou astrocytes

matures, ex. le marqueur S100 β). Les astrocytes ont des fonctions essentielles dans la régulation de plusieurs processus physiologiques et dans la réponse aux lésions du système nerveux central. De plus, des études montrent que les astrocytes sont impliqués dans l'apprentissage et dans la mémoire^{362,363}. Il serait donc intéressant d'analyser *in vivo* les effets du défaut de différenciation des astrocytes du à l'inactivation de Pax6 sur ces fonctions cérébrales et sur la réponse aux lésions afin d'améliorer les connaissances sur les fonctions des astrocytes lors de ces processus.

Conclusions

Les résultats de cette étude montrent que Pax6 joue un rôle dans la différenciation astrocytaire des cellules souches neurales et dans le développement des astrocytes. Les résultats obtenus en utilisant comme modèle expérimentale les cultures de cellules souches neurales embryonnaires nulles pour Pax6, suggèrent que ce gène contrôle la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches neurales au dernier stade du développement embryonnaire, et affecte leur différenciation en astrocytes. La mutation conditionnelle de Pax6 dans les progéniteurs des astrocytes permet d'étudier le rôle de ce gène dans le développement des astrocytes après la naissance: les résultats obtenus en utilisant ce modèle expérimental montrent que Pax6 est impliqué dans le développement et la maturation de ces cellules. Les astrocytes régulent de nombreux processus physiologiques et sont impliqués dans plusieurs pathologies du système nerveux central⁹¹: l'amélioration des connaissances concernant les gènes et les mécanismes moléculaires impliqués dans leur développement permettra de mieux comprendre le rôle physiologique et les altérations pathologiques de ces cellules.

Bibliographie

1. Dixon, J.E. & Kintner, C.R. Cellular contacts required for neural induction in *Xenopus* embryos: evidence for two signals. *Development* **106**, 749-757 (1989).
2. Keller, R., Shih, J., Sater, A.K. & Moreno, C. Planar induction of convergence and extension of the neural plate by the organizer of *Xenopus*. *Dev Dyn* **193**, 218-234 (1992).
3. Ruiz i Altaba, A. Induction and axial patterning of the neural plate: planar and vertical signals. *J Neurobiol* **24**, 1276-1304 (1993).
4. Waddington, C.H. Organizers in Mammalian Development. *Nature* **138**, 125-125 (1936).
5. Smith, J.L. & Schoenwolf, G.C. Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci* **20**, 510-517 (1997).
6. Schoenwolf, G.C. Histological and ultrastructural studies of secondary neurulation in mouse embryos. *Am J Anat* **169**, 361-376 (1984).
7. Schoenwolf, G.C. & Delongo, J. Ultrastructure of secondary neurulation in the chick embryo. *Am J Anat* **158**, 43-63 (1980).
8. Vieira, C., *et al.* Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int J Dev Biol* **54**, 7-20 (2010).
9. Gilbert, S.F. *Developmental Biology.*, (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts USA, 2006).
10. Desmond, M.E. & Jacobson, A.G. Embryonic brain enlargement requires cerebrospinal fluid pressure. *Dev Biol* **57**, 188-198 (1977).
11. Roelink, H., *et al.* Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* **81**, 445-455 (1995).
12. Briscoe, J. & Ericson, J. The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 353-362 (1999).

13. Liem, K.F., Jr., Tremml, G., Roelink, H. & Jessell, T.M. Dorsal differentiation of neural plate cells induced by BMP-mediated signals from epidermal ectoderm. *Cell* **82**, 969-979 (1995).
14. Chiang, C., *et al.* Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407-413 (1996).
15. Oliver, G. & Gruss, P. Current views on eye development. *Trends Neurosci* **20**, 415-421 (1997).
16. Turner, D.L. & Cepko, C.L. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* **328**, 131-136 (1987).
17. Harada, T., Harada, C. & Parada, L.F. Molecular regulation of visual system development: more than meets the eye. *Genes Dev* **21**, 367-378 (2007).
18. Marquardt, T. & Gruss, P. Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci* **25**, 32-38 (2002).
19. Sauer, F.C. Mitosis in the neural tube. *The Journal of Comparative Neurology*, 377-405 (1935).
20. Malatesta, P., Appolloni, I. & Calzolari, F. Radial glia and neural stem cells. *Cell Tissue Res* **331**, 165-178 (2008).
21. Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A. & Huttner, W.B. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12425-12430 (1997).
22. Aaku-Saraste, E., Hellwig, A. & Huttner, W.B. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol* **180**, 664-679 (1996).
23. Manabe, N., *et al.* Association of ASIP/mPAR-3 with adherens junctions of mouse neuroepithelial cells. *Dev Dyn* **225**, 61-69 (2002).
24. Zhadanov, A.B., *et al.* Absence of the tight junctional protein AF-6 disrupts epithelial cell-cell junctions and cell polarity during mouse development. *Curr Biol* **9**, 880-888 (1999).

25. Wodarz, A. & Huttner, W.B. Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mech Dev* **120**, 1297-1309 (2003).
26. Rakic, P. A small step for the cell, a giant leap for mankind: a hypothesis of neocortical expansion during evolution. *Trends Neurosci* **18**, 383-388 (1995).
27. Frederiksen, K. & McKay, R.D. Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci* **8**, 1144-1151 (1988).
28. Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N. & Gotz, M. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev Biol* **229**, 15-30 (2001).
29. Park, D., *et al.* The radial glia antibody RC2 recognizes a protein encoded by Nestin. *Biochem Biophys Res Commun* **382**, 588-592 (2009).
30. Malatesta, P., *et al.* Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron* **37**, 751-764 (2003).
31. Aaku-Saraste, E., Oback, B., Hellwig, A. & Huttner, W.B. Neuroepithelial cells downregulate their plasma membrane polarity prior to neural tube closure and neurogenesis. *Mech Dev* **69**, 71-81 (1997).
32. Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W. & Huttner, W.B. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3196-3201 (2004).
33. Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G. & Heintz, N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* **41**, 881-890 (2004).
34. Kriegstein, A. & Alvarez-Buylla, A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* **32**, 149-184 (2009).
35. Farkas, L.M. & Huttner, W.B. The cell biology of neural stem and progenitor cells and its significance for their proliferation versus differentiation during mammalian brain development. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 707-715 (2008).
36. Kowalczyk, T., *et al.* Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex* **19**, 2439-2450 (2009).

37. Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. & Kriegstein, A.R. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* **7**, 136-144 (2004).
38. Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V. & Kriegstein, A.R. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol* **508**, 28-44 (2008).
39. Englund, C., *et al.* Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* **25**, 247-251 (2005).
40. Gotz, M., Stoykova, A. & Gruss, P. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* **21**, 1031-1044 (1998).
41. Tamai, H., *et al.* Pax6 transcription factor is required for the interkinetic nuclear movement of neuroepithelial cells. *Genes Cells* **12**, 983-996 (2007).
42. Duparc, R.H., *et al.* Pax6 controls the proliferation rate of neuroepithelial progenitors from the mouse optic vesicle. *Dev Biol* **301**, 374-387 (2007).
43. Nieto, M., *et al.* Expression of Cux-1 and Cux-2 in the subventricular zone and upper layers II-IV of the cerebral cortex. *J Comp Neurol* **479**, 168-180 (2004).
44. Zimmer, C., Tiveron, M.C., Bodmer, R. & Cremer, H. Dynamics of Cux2 expression suggests that an early pool of SVZ precursors is fated to become upper cortical layer neurons. *Cereb Cortex* **14**, 1408-1420 (2004).
45. Tarabykin, V., Stoykova, A., Usman, N. & Gruss, P. Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development* **128**, 1983-1993 (2001).
46. Heins, N., *et al.* Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat Neurosci* **5**, 308-315 (2002).
47. Noctor, S.C., *et al.* Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci* **22**, 3161-3173 (2002).
48. Ihrie, R.A. & Alvarez-Buylla, A. Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res* **331**, 179-191 (2008).

49. Williams, B.P. & Price, J. Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex. *Neuron* **14**, 1181-1188 (1995).
50. Malatesta, P., Hartfuss, E. & Gotz, M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* **127**, 5253-5263 (2000).
51. Edwards, M.A., Yamamoto, M. & Caviness, V.S., Jr. Organization of radial glia and related cells in the developing murine CNS. An analysis based upon a new monoclonal antibody marker. *Neuroscience* **36**, 121-144 (1990).
52. Misson, J.P., Edwards, M.A., Yamamoto, M. & Caviness, V.S., Jr. Identification of radial glial cells within the developing murine central nervous system: studies based upon a new immunohistochemical marker. *Brain Res Dev Brain Res* **44**, 95-108 (1988).
53. Chenn, A., Zhang, Y.A., Chang, B.T. & McConnell, S.K. Intrinsic polarity of mammalian neuroepithelial cells. *Mol Cell Neurosci* **11**, 183-193 (1998).
54. Halfter, W., Dong, S., Yip, Y.P., Willem, M. & Mayer, U. A critical function of the pial basement membrane in cortical histogenesis. *J Neurosci* **22**, 6029-6040 (2002).
55. Voigt, T. Development of glial cells in the cerebral wall of ferrets: direct tracing of their transformation from radial glia into astrocytes. *J Comp Neurol* **289**, 74-88 (1989).
56. Feng, L., Hatten, M.E. & Heintz, N. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* **12**, 895-908 (1994).
57. Vives, V., Alonso, G., Solal, A.C., Joubert, D. & Legraverend, C. Visualization of S100B-positive neurons and glia in the central nervous system of EGFP transgenic mice. *J Comp Neurol* **457**, 404-419 (2003).
58. Schnitzer, J., Franke, W.W. & Schachner, M. Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol* **90**, 435-447 (1981).
59. Bartsch, S., *et al.* Expression of tenascin in the developing and adult cerebellar cortex. *J Neurosci* **12**, 736-749 (1992).

60. Gotz, M., Bolz, J., Joester, A. & Faissner, A. Tenascin-C synthesis and influence on axonal growth during rat cortical development. *Eur J Neurosci* **9**, 496-506 (1997).
61. Akimoto, J., Itoh, H., Miwa, T. & Ikeda, K. Immunohistochemical study of glutamine synthetase expression in early glial development. *Brain Res Dev Brain Res* **72**, 9-14 (1993).
62. Levitt, P. & Rakic, P. Immunoperoxidase localization of glial fibrillary acidic protein in radial glial cells and astrocytes of the developing rhesus monkey brain. *J Comp Neurol* **193**, 815-840 (1980).
63. Sancho-Tello, M., Valles, S., Montoliu, C., Renau-Piqueras, J. & Guerri, C. Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. *Glia* **15**, 157-166 (1995).
64. Gadisseux, J.F. & Evrard, P. Glial-neuronal relationship in the developing central nervous system. A histochemical-electron microscope study of radial glial cell particulate glycogen in normal and reeler mice and the human fetus. *Dev Neurosci* **7**, 12-32 (1985).
65. Fox, I.J., *et al.* Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in mouse forebrain germinal zones--implications for stem cell biology. *Brain Res Dev Brain Res* **153**, 121-125 (2004).
66. Rakic, P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol* **145**, 61-83 (1972).
67. Gotz, M., Hartfuss, E. & Malatesta, P. Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. *Brain Res Bull* **57**, 777-788 (2002).
68. Bertrand, N., Castro, D.S. & Guillemot, F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517-530 (2002).
69. Murre, C., McCaw, P.S. & Baltimore, D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**, 777-783 (1989).

70. Cabrera, C.V. & Alonso, M.C. Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *EMBO J* **10**, 2965-2973 (1991).
71. Johnson, J.E., Birren, S.J., Saito, T. & Anderson, D.J. DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3596-3600 (1992).
72. Massari, M.E. & Murre, C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* **20**, 429-440 (2000).
73. Lewis, J. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Semin Cell Dev Biol* **9**, 583-589 (1998).
74. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. & Lake, R.J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776 (1999).
75. Vetter, M. A turn of the helix: preventing the glial fate. *Neuron* **29**, 559-562 (2001).
76. Farah, M.H., *et al.* Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* **127**, 693-702 (2000).
77. Ohnuma, S., Philpott, A. & Harris, W.A. Cell cycle and cell fate in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 66-73 (2001).
78. Mutoh, H., Naya, F.J., Tsai, M.J. & Leiter, A.B. The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Dev* **12**, 820-830 (1998).
79. Bae, S., Bessho, Y., Hojo, M. & Kageyama, R. The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development* **127**, 2933-2943 (2000).
80. Cau, E., Casarosa, S. & Guillemot, F. Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* **129**, 1871-1880 (2002).
81. Fode, C., *et al.* The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* **20**, 483-494 (1998).
82. Miyata, T., Maeda, T. & Lee, J.E. NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev* **13**, 1647-1652 (1999).

83. Ben-Arie, N., *et al.* Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* **390**, 169-172 (1997).
84. Bermingham, N.A., *et al.* Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* **284**, 1837-1841 (1999).
85. Bermingham, N.A., *et al.* Proprioceptor pathway development is dependent on Math1. *Neuron* **30**, 411-422 (2001).
86. Goridis, C. & Brunet, J.F. Transcriptional control of neurotransmitter phenotype. *Curr Opin Neurobiol* **9**, 47-53 (1999).
87. Mizuguchi, R., *et al.* Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* **31**, 757-771 (2001).
88. Scardigli, R., Schuurmans, C., Gradwohl, G. & Guillemot, F. Crossregulation between Neurogenin2 and pathways specifying neuronal identity in the spinal cord. *Neuron* **31**, 203-217 (2001).
89. Inoue, T., *et al.* Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* **129**, 831-842 (2002).
90. Hatakeyama, J., Tomita, K., Inoue, T. & Kageyama, R. Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* **128**, 1313-1322 (2001).
91. Sofroniew, M.V. & Vinters, H.V. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* **119**, 7-35 (2010).
92. Sofroniew, M.V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* **32**, 638-647 (2009).
93. Parnavelas, J.G. Glial cell lineages in the rat cerebral cortex. *Exp Neurol* **156**, 418-429 (1999).
94. Miller, F.D. & Gauthier, A.S. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* **54**, 357-369 (2007).
95. Ernst, M. & Jenkins, B.J. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends Genet* **20**, 23-32 (2004).

96. Robledo, O., *et al.* Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem* **272**, 4855-4863 (1997).
97. Bonni, A., *et al.* Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)* **278**, 477-483 (1997).
98. Nakashima, K., *et al.* Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science (New York, N.Y.)* **284**, 479-482 (1999).
99. Namihira, M., Nakashima, K. & Taga, T. Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in a immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS letters* **572**, 184-188 (2004).
100. Kalkhoven, E. CBP and p300: HATs for different occasions. *Biochem Pharmacol* **68**, 1145-1155 (2004).
101. Patterson, P.H. & Fann, M.J. Further studies of the distribution of CDF/LIF mRNA. *Ciba Found Symp* **167**, 125-135; discussion 135-140 (1992).
102. Stockli, K.A., *et al.* Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* **115**, 447-459 (1991).
103. Bugga, L., Gadiant, R.A., Kwan, K., Stewart, C.L. & Patterson, P.H. Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient in leukemia inhibitory factor. *J Neurobiol* **36**, 509-524 (1998).
104. Masu, Y., *et al.* Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* **365**, 27-32 (1993).
105. Barnabe-Heider, F., *et al.* Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* **48**, 253-265 (2005).
106. Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H. & Taga, T. Astrocyte differentiation mediated by LIF in cooperation with BMP2. *FEBS Lett* **457**, 43-46 (1999).
107. Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**, 233-241 (2004).
108. Gross, R.E., *et al.* Bone morphogenetic proteins promote astroglial lineage commitment by mammalian subventricular zone progenitor cells. *Neuron* **17**, 595-606 (1996).

109. Rajan, P. & McKay, R.D. Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 3620-3629 (1998).
110. Sun, Y., *et al.* Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* **104**, 365-376 (2001).
111. Nakashima, K., *et al.* BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 5868-5873 (2001).
112. Takizawa, T., *et al.* DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Developmental cell* **1**, 749-758 (2001).
113. Fan, G., *et al.* DNA methylation controls the timing of astrogliogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development (Cambridge, England)* **132**, 3345-3356 (2005).
114. Gaiano, N., Nye, J.S. & Fishell, G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* **26**, 395-404 (2000).
115. Ge, W., *et al.* Notch signaling promotes astrogliogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation. *Journal of neuroscience research* **69**, 848-860 (2002).
116. Hermanson, O., Jepsen, K. & Rosenfeld, M.G. N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* **419**, 934-939 (2002).
117. Namihira, M., *et al.* Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell* **16**, 245-255 (2009).
118. Kamakura, S., *et al.* Hes binding to STAT3 mediates crosstalk between Notch and JAK-STAT signalling. *Nat Cell Biol* **6**, 547-554 (2004).
119. Sardi, S.P., Murtie, J., Koirala, S., Patten, B.A. & Corfas, G. Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain. *Cell* **127**, 185-197 (2006).
120. Schmid, R.S., *et al.* Neuregulin 1-erbB2 signaling is required for the establishment of radial glia and their transformation into astrocytes in cerebral cortex. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4251-4256 (2003).
121. Sun, Y., Goderie, S.K. & Temple, S. Asymmetric distribution of EGFR receptor during mitosis generates diverse CNS progenitor cells. *Neuron* **45**, 873-886 (2005).
 122. Burrows, R.C., Wancio, D., Levitt, P. & Lillien, L. Response diversity and the timing of progenitor cell maturation are regulated by developmental changes in EGFR expression in the cortex. *Neuron* **19**, 251-267 (1997).
 123. Viti, J., Feathers, A., Phillips, J. & Lillien, L. Epidermal growth factor receptors control competence to interpret leukemia inhibitory factor as an astrocyte inducer in developing cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 3385-3393 (2003).
 124. Leutz, A. & Schachner, M. Epidermal growth factor stimulates DNA-synthesis of astrocytes in primary cerebellar cultures. *Cell Tissue Res* **220**, 393-404 (1981).
 125. Simpson, D.L., Morrison, R., de Vellis, J. & Herschman, H.R. Epidermal growth factor binding and mitogenic activity on purified populations of cells from the central nervous system. *J Neurosci Res* **8**, 453-462 (1982).
 126. Kenigsberg, R.L., Mazzoni, I.E., Collier, B. & Cuello, A.C. Epidermal growth factor affects both glia and cholinergic neurons in septal cell cultures. *Neuroscience* **50**, 85-97 (1992).
 127. Grove, J., Gomez, J., Kentroti, S. & Vernadakis, A. Plasticity of astrocytes derived from aged mouse cerebral hemispheres: changes with cell passage and immortalization. *Brain Res Bull* **39**, 211-217 (1996).
 128. Loret, C., Sensenbrenner, M. & Labourdette, G. Differential phenotypic expression induced in cultured rat astroblasts by acidic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J Biol Chem* **264**, 8319-8327 (1989).
 129. Zelenaiia, O., *et al.* Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Pharmacol* **57**, 667-678 (2000).

130. Miller, S., Romano, C. & Cotman, C.W. Growth factor upregulation of a phosphoinositide-coupled metabotropic glutamate receptor in cortical astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**, 6103-6109 (1995).
131. Minoshima, T. & Nakanishi, S. Structural organization of the mouse metabotropic glutamate receptor subtype 3 gene and its regulation by growth factors in cultured cortical astrocytes. *J Biochem* **126**, 889-896 (1999).
132. Song, M.R. & Ghosh, A. FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nature neuroscience* **7**, 229-235 (2004).
133. Ramon, Y. & Cajal, S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés.*, (Maloine, Paris, 1909).
134. Peters, A., Palay, S.L. & Webster, H.D. *The fine structure of the nervous system*, (Oxford University Press, New York, 1991).
135. Powell, E.M. & Geller, H.M. Dissection of astrocyte-mediated cues in neuronal guidance and process extension. *Glia* **26**, 73-83 (1999).
136. Christopherson, K.S., *et al.* Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* **120**, 421-433 (2005).
137. Obara, M., Szeliga, M. & Albrecht, J. Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: facts and hypotheses. *Neurochem Int* **52**, 905-919 (2008).
138. Simard, M. & Nedergaard, M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* **129**, 877-896 (2004).
139. Zador, Z., Stiver, S., Wang, V. & Manley, G.T. Role of aquaporin-4 in cerebral edema and stroke. *Handb Exp Pharmacol*, 159-170 (2009).
140. Sattler, R. & Rothstein, J.D. Regulation and dysregulation of glutamate transporters. *Handb Exp Pharmacol*, 277-303 (2006).
141. Seifert, G., Schilling, K. & Steinhauser, C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nature reviews. Neuroscience* **7**, 194-206 (2006).

142. Charles, A.C., Merrill, J.E., Dirksen, E.R. & Sanderson, M.J. Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* **6**, 983-992 (1991).
143. Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S. & Smith, S.J. Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science (New York, N.Y.)* **247**, 470-473 (1990).
144. Shigetomi, E., Bowser, D.N., Sofroniew, M.V. & Khakh, B.S. Two forms of astrocyte calcium excitability have distinct effects on NMDA receptor-mediated slow inward currents in pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 6659-6663 (2008).
145. Perea, G., Navarrete, M. & Araque, A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neurosciences* **32**, 421-431 (2009).
146. Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P. & Haydon, P.G. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* **22**, 208-215 (1999).
147. Garcia-Segura, L.M. & Melcangi, R.C. Steroids and glial cell function. *Glia* **54**, 485-498 (2006).
148. Stellwagen, D. & Malenka, R.C. Synaptic scaling mediated by glial TNF- α . *Nature* **440**, 1054-1059 (2006).
149. Gordon, G.R., Mulligan, S.J. & MacVicar, B.A. Astrocyte control of the cerebrovasculature. *Glia* **55**, 1214-1221 (2007).
150. Koehler, R.C., Roman, R.J. & Harder, D.R. Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends in neurosciences* **32**, 160-169 (2009).
151. Schummers, J., Yu, H. & Sur, M. Tuned responses of astrocytes and their influence on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science (New York, N.Y.)* **320**, 1638-1643 (2008).
152. Wolf, F. & Kirchhoff, F. Neuroscience. Imaging astrocyte activity. *Science (New York, N.Y.)* **320**, 1597-1599 (2008).
153. Abbott, N.J., Ronnback, L. & Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience* **7**, 41-53 (2006).

154. Brown, A.M. & Ransom, B.R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* **55**, 1263-1271 (2007).
155. Suh, S.W., *et al.* Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)pro pyl]-1H-indole-2-carboxamide). *J Pharmacol Exp Ther* **321**, 45-50 (2007).
156. Pellerin, L. & Magistretti, P.J. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10625-10629 (1994).
157. Furnari, F.B., *et al.* Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev* **21**, 2683-2710 (2007).
158. Louis, D.N., *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**, 97-109 (2007).
159. Singh, S.K., *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401 (2004).
160. Hewett, J.A. Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J Neurochem* **110**, 1717-1736 (2009).
161. Nedergaard, M., Ransom, B. & Goldman, S.A. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* **26**, 523-530 (2003).
162. Oberheim, N.A., *et al.* Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* **29**, 3276-3287 (2009).
163. Baumann, N. & Pham-Dinh, D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **81**, 871-927 (2001).
164. Lu, Q.R., *et al.* Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* **25**, 317-329 (2000).
165. Zhou, Q., Wang, S. & Anderson, D.J. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* **25**, 331-343 (2000).

166. Spassky, N., *et al.* Multiple restricted origin of oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 8331-8343 (1998).
167. He, W., Ingraham, C., Rising, L., Goderie, S. & Temple, S. Multipotent stem cells from the mouse basal forebrain contribute GABAergic neurons and oligodendrocytes to the cerebral cortex during embryogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 8854-8862 (2001).
168. Petryniak, M.A., Potter, G.B., Rowitch, D.H. & Rubenstein, J.L. Dlx1 and Dlx2 control neuronal versus oligodendroglial cell fate acquisition in the developing forebrain. *Neuron* **55**, 417-433 (2007).
169. Kessaris, N., *et al.* Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature neuroscience* **9**, 173-179 (2006).
170. Noble, M. Precursor cell transitions in oligodendrocyte development. *J Cell Biol* **148**, 839-842 (2000).
171. Menn, B., *et al.* Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* **26**, 7907-7918 (2006).
172. Alvarez-Buylla, A. & Lim, D.A. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* **41**, 683-686 (2004).
173. Gage, F.H. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* **22**, 612-613 (2002).
174. Altman, J. & Das, G.D. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* **124**, 319-335 (1965).
175. Corotto, F.S., Henegar, J.A. & Maruniak, J.A. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neurosci Lett* **149**, 111-114 (1993).
176. Luskin, M.B. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* **11**, 173-189 (1993).

177. Seki, T. & Arai, Y. Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* **13**, 2351-2358 (1993).
178. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* **17**, 5046-5061 (1997).
179. Lois, C. & Alvarez-Buylla, A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2074-2077 (1993).
180. Cameron, H.A., Woolley, C.S., McEwen, B.S. & Gould, E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* **56**, 337-344 (1993).
181. Kaplan, M.S. & Bell, D.H. Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* **4**, 1429-1441 (1984).
182. Gotz, M. Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist* **9**, 379-397 (2003).
183. Altman, J. Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis. *Exp Neurol* **16**, 263-278 (1966).
184. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* **97**, 703-716 (1999).
185. Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11619-11624 (1999).
186. Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* **36**, 1021-1034 (2002).
187. Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Chain migration of neuronal precursors. *Science* **271**, 978-981 (1996).

188. Peretto, P., Bonfanti, L., Merighi, A. & Fasolo, A. Carnosine-like immunoreactivity in astrocytes of the glial tubes and in newly-generated cells within the tangential part of the rostral migratory stream of rodents. *Neuroscience* **85**, 527-542 (1998).
189. Mercier, F., Kitasako, J.T. & Hatton, G.I. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol* **451**, 170-188 (2002).
190. Platel, J.C., Gordon, V., Heintz, T. & Bordey, A. GFAP-GFP neural progenitors are antigenically homogeneous and anchored in their enclosed mosaic niche. *Glia* **57**, 66-78 (2009).
191. Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S. & Alvarez-Buylla, A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* **21**, 7153-7160 (2001).
192. Basak, O. & Taylor, V. Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell Mol Life Sci* **66**, 1057-1072 (2009).
193. Capela, A. & Temple, S. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* **35**, 865-875 (2002).
194. Liu, H.K., *et al.* The nuclear receptor tailless is required for neurogenesis in the adult subventricular zone. *Genes Dev* **22**, 2473-2478 (2008).
195. Reynolds, B.A. & Weiss, S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science (New York, N.Y.)* **255**, 1707-1710 (1992).
196. Weiss, S., *et al.* Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? *Trends in neurosciences* **19**, 387-393 (1996).
197. Morshead, C.M., *et al.* Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* **13**, 1071-1082 (1994).
198. Jackson, E.L., *et al.* PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* **51**, 187-199 (2006).

199. Zheng, W., Nowakowski, R.S. & Vaccarino, F.M. Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci* **26**, 181-196 (2004).
200. Reynolds, B.A. & Rietze, R.L. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nat Methods* **2**, 333-336 (2005).
201. Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* **3**, 265-278 (2008).
202. Merkle, F.T., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17528-17532 (2004).
203. Merkle, F.T. & Alvarez-Buylla, A. Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 704-709 (2006).
204. Coskun, V., *et al.* CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 1026-1031 (2008).
205. Johansson, C.B., *et al.* Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **96**, 25-34 (1999).
206. Chiasson, B.J., Tropepe, V., Morshead, C.M. & van der Kooy, D. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**, 4462-4471 (1999).
207. Spassky, N., *et al.* Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* **25**, 10-18 (2005).
208. Eriksson, P.S., *et al.* Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313-1317 (1998).
209. Kaplan, M.S. & Hinds, J.W. Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science (New York, N.Y.)* **197**, 1092-1094 (1977).

210. Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. & Kronenberg, G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in neurosciences* **27**, 447-452 (2004).
211. Shors, T.J., Townsend, D.A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. & Gould, E. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus* **12**, 578-584 (2002).
212. Zhao, C., Deng, W. & Gage, F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* **132**, 645-660 (2008).
213. Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., McEwen, B.S. & Alvarez-Buylla, A. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* **478**, 359-378 (2004).
214. Filippov, V., *et al.* Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* **23**, 373-382 (2003).
215. Fukuda, S., *et al.* Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J Neurosci* **23**, 9357-9366 (2003).
216. Song, H.J., Stevens, C.F. & Gage, F.H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature neuroscience* **5**, 438-445 (2002).
217. Eckenhoff, M.F. & Rakic, P. Radial organization of the hippocampal dentate gyrus: a Golgi, ultrastructural, and immunocytochemical analysis in the developing rhesus monkey. *J Comp Neurol* **223**, 1-21 (1984).
218. Cameron, H.A., Tanapat, P. & Gould, E. Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience* **82**, 349-354 (1998).
219. Gould, E., Cameron, H.A., Daniels, D.C., Woolley, C.S. & McEwen, B.S. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**, 3642-3650 (1992).

220. Gould, E., Cameron, H.A. & McEwen, B.S. Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* **340**, 551-565 (1994).
221. Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 3206-3212 (1998).
222. Santarelli, L., *et al.* Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science (New York, N.Y.)* **301**, 805-809 (2003).
223. Ma, D.K., Bonaguidi, M.A., Ming, G.L. & Song, H. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res* **19**, 672-682 (2009).
224. Morrison, S.J. & Spradling, A.C. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* **132**, 598-611 (2008).
225. Palmer, T.D., Willhoite, A.R. & Gage, F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* **425**, 479-494 (2000).
226. Craig, C.G., *et al.* In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 2649-2658 (1996).
227. Kuhn, H.G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J. & Gage, F.H. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 5820-5829 (1997).
228. Lim, D.A., *et al.* Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* **28**, 713-726 (2000).
229. Ueki, T., *et al.* A novel secretory factor, Neurogenesisin-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 11732-11740 (2003).

230. Bauer, S. & Patterson, P.H. Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewal in the adult brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 12089-12099 (2006).
231. Palma, V., *et al.* Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**, 335-344 (2005).
232. Kovacs, J.J., *et al.* Beta-arrestin-mediated localization of smoothened to the primary cilium. *Science* **320**, 1777-1781 (2008).
233. Schanzer, A., *et al.* Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* **14**, 237-248 (2004).
234. Ramirez-Castillejo, C., *et al.* Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* **9**, 331-339 (2006).
235. Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F. & Bordey, A. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* **8**, 1179-1187 (2005).
236. Baker, S.A., Baker, K.A. & Hagg, T. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci* **20**, 575-579 (2004).
237. Lie, D.C., *et al.* Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* **437**, 1370-1375 (2005).
238. Doetsch, F. A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 543-550 (2003).
239. Callaerts, P., Halder, G. & Gehring, W.J. PAX-6 in development and evolution. *Annu Rev Neurosci* **20**, 483-532 (1997).
240. Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G. & Noll, M. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of Drosophila. *Cell* **47**, 1033-1040 (1986).
241. Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S. & Noll, M. Structure of the segmentation gene paired and the Drosophila PRD gene set as part of a gene network. *Cell* **47**, 735-746 (1986).

242. Bopp, D., Jamet, E., Baumgartner, S., Burri, M. & Noll, M. Isolation of two tissue-specific *Drosophila* paired box genes, Pox meso and Pox neuro. *EMBO J* **8**, 3447-3457 (1989).
243. Burri, M., Tromvoukis, Y., Bopp, D., Frigerio, G. & Noll, M. Conservation of the paired domain in metazoans and its structure in three isolated human genes. *The EMBO journal* **8**, 1183-1190 (1989).
244. Dressler, G.R. & Douglass, E.C. Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 1179-1183 (1992).
245. Robson, E.J., He, S.J. & Eccles, M.R. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat Rev Cancer* **6**, 52-62 (2006).
246. Cai, Q., *et al.* Pax2 expression occurs in renal medullary epithelial cells in vivo and in cell culture, is osmoregulated, and promotes osmotic tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 503-508 (2005).
247. Seale, P., *et al.* Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* **102**, 777-786 (2000).
248. Wang, Q., *et al.* Pax genes in embryogenesis and oncogenesis. *J Cell Mol Med* **12**, 2281-2294 (2008).
249. Puschel, A.W., Gruss, P. & Westerfield, M. Sequence and expression pattern of pax-6 are highly conserved between zebrafish and mice. *Development (Cambridge, England)* **114**, 643-651 (1992).
250. Ton, C.C., *et al.* Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell* **67**, 1059-1074 (1991).
251. Walther, C. & Gruss, P. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development (Cambridge, England)* **113**, 1435-1449 (1991).
252. Quring, R., Walldorf, U., Kloter, U. & Gehring, W.J. Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* **265**, 785-789 (1994).

253. Czerny, T. & Busslinger, M. DNA-binding and transactivation properties of Pax-6: three amino acids in the paired domain are responsible for the different sequence recognition of Pax-6 and BSAP (Pax-5). *Mol Cell Biol* **15**, 2858-2871 (1995).
254. Kozmik, Z., Czerny, T. & Busslinger, M. Alternatively spliced insertions in the paired domain restrict the DNA sequence specificity of Pax6 and Pax8. *The EMBO journal* **16**, 6793-6803 (1997).
255. Simpson, T.I. & Price, D.J. Pax6; a pleiotropic player in development. *Bioessays* **24**, 1041-1051 (2002).
256. Singh, S., Stellrecht, C.M., Tang, H.K. & Saunders, G.F. Modulation of PAX6 homeodomain function by the paired domain. *J Biol Chem* **275**, 17306-17313 (2000).
257. Epstein, J.A., *et al.* Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes & development* **8**, 2022-2034 (1994).
258. Richardson, J., Cvekl, A. & Wistow, G. Pax-6 is essential for lens-specific expression of zeta-crystallin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4676-4680 (1995).
259. Kammandel, B., *et al.* Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity. *Dev Biol* **205**, 79-97 (1999).
260. Kim, J. & Lauderdale, J.D. Analysis of Pax6 expression using a BAC transgene reveals the presence of a paired-less isoform of Pax6 in the eye and olfactory bulb. *Developmental biology* **292**, 486-505 (2006).
261. Kim, J. & Lauderdale, J.D. Overexpression of pairedless Pax6 in the retina disrupts corneal development and affects lens cell survival. *Developmental biology* **313**, 434-454 (2008).
262. Haubst, N., *et al.* Molecular dissection of Pax6 function: the specific roles of the paired domain and homeodomain in brain development. *Development (Cambridge, England)* **131**, 6131-6140 (2004).

263. Plaza, S., Dozier, C. & Saule, S. Quail Pax-6 (Pax-QNR) encodes a transcription factor able to bind and trans-activate its own promoter. *Cell Growth Differ* **4**, 1041-1050 (1993).
264. Plaza, S., Dozier, C., Turque, N. & Saule, S. Quail Pax-6 (Pax-QNR) mRNAs are expressed from two promoters used differentially during retina development and neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* **15**, 3344-3353 (1995).
265. Carriere, C., *et al.* Characterization of quail Pax-6 (Pax-QNR) proteins expressed in the neuroretina. *Mol Cell Biol* **13**, 7257-7266 (1993).
266. Bentley, C.A., *et al.* Pax6 is implicated in murine pituitary endocrine function. *Endocrine* **10**, 171-177 (1999).
267. Hill, M.E., Asa, S.L. & Drucker, D.J. Essential requirement for Pax6 in control of enteroendocrine proglucagon gene transcription. *Mol Endocrinol* **13**, 1474-1486 (1999).
268. Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carriere, C. & Saule, S. Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol Endocrinol* **8**, 929-938 (1994).
269. Hill, R.E., *et al.* Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* **354**, 522-525 (1991).
270. Hogan, B.L., *et al.* Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* **97**, 95-110 (1986).
271. Schmahl, W., Knoedlseder, M., Favor, J. & Davidson, D. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations are associated with Small eye (Sey) in the mouse, a point mutation at the Pax-6-locus. *Acta neuropathologica* **86**, 126-135 (1993).
272. Glaser, T., *et al.* PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat Genet* **7**, 463-471 (1994).

273. Chow, R.L., Altmann, C.R., Lang, R.A. & Hemmati-Brivanlou, A. Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development (Cambridge, England)* **126**, 4213-4222 (1999).
274. Halder, G., Callaerts, P. & Gehring, W.J. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. *Science (New York, N.Y.)* **267**, 1788-1792 (1995).
275. Gehring, W.J. & Ikeo, K. Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* **15**, 371-377 (1999).
276. Nomura, T., Haba, H. & Osumi, N. Role of a transcription factor Pax6 in the developing vertebrate olfactory system. *Dev Growth Differ* **49**, 683-690 (2007).
277. Sander, M., *et al.* Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes & development* **11**, 1662-1673 (1997).
278. St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A. & Gruss, P. Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* **387**, 406-409 (1997).
279. Tang, H.K., Singh, S. & Saunders, G.F. Dissection of the transactivation function of the transcription factor encoded by the eye developmental gene PAX6. *J Biol Chem* **273**, 7210-7221 (1998).
280. Mikkola, I., Bruun, J.A., Holm, T. & Johansen, T. Superactivation of Pax6-mediated transactivation from paired domain-binding sites by dna-independent recruitment of different homeodomain proteins. *J Biol Chem* **276**, 4109-4118 (2001).
281. Osumi, N., Shinohara, H., Numayama-Tsuruta, K. & Maekawa, M. Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator. *Stem Cells* **26**, 1663-1672 (2008).
282. Inoue, T., Nakamura, S. & Osumi, N. Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Developmental biology* **219**, 373-383 (2000).
283. Manuel, M. & Price, D.J. Role of Pax6 in forebrain regionalization. *Brain Res Bull* **66**, 387-393 (2005).

284. Puelles, L., *et al.* Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. *The Journal of comparative neurology* **424**, 409-438 (2000).
285. Toresson, H., Potter, S.S. & Campbell, K. Genetic control of dorsal-ventral identity in the telencephalon: opposing roles for *Pax6* and *Gsh2*. *Development (Cambridge, England)* **127**, 4361-4371 (2000).
286. Yun, K., Potter, S. & Rubenstein, J.L. *Gsh2* and *Pax6* play complementary roles in dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *Development (Cambridge, England)* **128**, 193-205 (2001).
287. Scardigli, R., Baumer, N., Gruss, P., Guillemot, F. & Le Roux, I. Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene *Neurogenin2* by *Pax6*. *Development (Cambridge, England)* **130**, 3269-3281 (2003).
288. Fode, C., *et al.* A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes & development* **14**, 67-80 (2000).
289. Inoue, T., *et al.* Role of cadherins in maintaining the compartment boundary between the cortex and striatum during development. *Development (Cambridge, England)* **128**, 561-569 (2001).
290. Fishell, G., Mason, C.A. & Hatten, M.E. Dispersion of neural progenitors within the germinal zones of the forebrain. *Nature* **362**, 636-638 (1993).
291. Chapouton, P., Gartner, A. & Gotz, M. The role of *Pax6* in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia. *Development (Cambridge, England)* **126**, 5569-5579 (1999).
292. Stoykova, A., Gotz, M., Gruss, P. & Price, J. *Pax6*-dependent regulation of adhesive patterning, R-cadherin expression and boundary formation in developing forebrain. *Development (Cambridge, England)* **124**, 3765-3777 (1997).
293. Chapouton, P., Schuurmans, C., Guillemot, F. & Gotz, M. The transcription factor neurogenin 2 restricts cell migration from the cortex to the striatum. *Development (Cambridge, England)* **128**, 5149-5159 (2001).
294. Muzio, L., *et al.* Conversion of cerebral cortex into basal ganglia in *Emx2*(-/-) *Pax6*(Sey/Sey) double-mutant mice. *Nature neuroscience* **5**, 737-745 (2002).

295. Muzio, L., *et al.* Emx2 and Pax6 control regionalization of the pre-neuronogenic cortical primordium. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* **12**, 129-139 (2002).
296. Grindley, J.C., Hargett, L.K., Hill, R.E., Ross, A. & Hogan, B.L. Disruption of PAX6 function in mice homozygous for the Pax6^{Sey-1}Neu mutation produces abnormalities in the early development and regionalization of the diencephalon. *Mechanisms of development* **64**, 111-126 (1997).
297. Mastick, G.S., Davis, N.M., Andrew, G.L. & Easter, S.S., Jr. Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development (Cambridge, England)* **124**, 1985-1997 (1997).
298. Pratt, T., *et al.* A role for Pax6 in the normal development of dorsal thalamus and its cortical connections. *Development (Cambridge, England)* **127**, 5167-5178 (2000).
299. Warren, N. & Price, D.J. Roles of Pax-6 in murine diencephalic development. *Development (Cambridge, England)* **124**, 1573-1582 (1997).
300. Andrews, G.L. & Mastick, G.S. R-cadherin is a Pax6-regulated, growth-promoting cue for pioneer axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 9873-9880 (2003).
301. Caric, D., Gooday, D., Hill, R.E., McConnell, S.K. & Price, D.J. Determination of the migratory capacity of embryonic cortical cells lacking the transcription factor Pax-6. *Development (Cambridge, England)* **124**, 5087-5096 (1997).
302. Stoykova, A., Fritsch, R., Walther, C. & Gruss, P. Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice. *Development (Cambridge, England)* **122**, 3453-3465 (1996).
303. Estivill-Torres, G., Pearson, H., van Heyningen, V., Price, D.J. & Rashbass, P. Pax6 is required to regulate the cell cycle and the rate of progression from symmetrical to asymmetrical division in mammalian cortical progenitors. *Development (Cambridge, England)* **129**, 455-466 (2002).
304. Philips, G.T., *et al.* Precocious retinal neurons: Pax6 controls timing of differentiation and determination of cell type. *Developmental biology* **279**, 308-321 (2005).

305. Sansom, S.N., *et al.* The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet* **5**, e1000511 (2009).
306. Marquardt, T., *et al.* Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105**, 43-55 (2001).
307. Xu, S., *et al.* The proliferation and expansion of retinal stem cells require functional Pax6. *Dev Biol* **304**, 713-721 (2007).
308. Le Mouellic, H., Lallemand, Y. & Brulet, P. Targeted replacement of the homeobox gene Hox-3.1 by the Escherichia coli lacZ in mouse chimeric embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4712-4716 (1990).
309. Quinn, J.C., *et al.* Pax6 controls cerebral cortical cell number by regulating exit from the cell cycle and specifies cortical cell identity by a cell autonomous mechanism. *Developmental biology* **302**, 50-65 (2007).
310. Bishop, K.M., Goudreau, G. & O'Leary, D.D. Regulation of area identity in the mammalian neocortex by Emx2 and Pax6. *Science (New York, N.Y.)* **288**, 344-349 (2000).
311. Shimojo, H., Ohtsuka, T. & Kageyama, R. Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron* **58**, 52-64 (2008).
312. Stoykova, A., Treichel, D., Hallonet, M. & Gruss, P. Pax6 modulates the dorsoventral patterning of the mammalian telencephalon. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 8042-8050 (2000).
313. Grinchuk, O., Kozmik, Z., Wu, X. & Tomarev, S. The Optomedin gene is a downstream target of Pax6. *J Biol Chem* **280**, 35228-35237 (2005).
314. Duparc, R.H., Boutemmine, D., Champagne, M.P., Tetreault, N. & Bernier, G. Pax6 is required for delta-catenin/neurojugin expression during retinal, cerebellar and cortical development in mice. *Developmental biology* **300**, 647-655 (2006).
315. Kohwi, M., Osumi, N., Rubenstein, J.L. & Alvarez-Buylla, A. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the

- olfactory bulb. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 6997-7003 (2005).
316. Hack, M.A., *et al.* Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nature neuroscience* **8**, 865-872 (2005).
317. Maekawa, M., *et al.* Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **10**, 1001-1014 (2005).
318. Nacher, J., *et al.* Expression of the transcription factor Pax 6 in the adult rat dentate gyrus. *Journal of neuroscience research* **81**, 753-761 (2005).
319. Sakurai, K. & Osumi, N. The neurogenesis-controlling factor, Pax6, inhibits proliferation and promotes maturation in murine astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 4604-4612 (2008).
320. Ogawa, Y., *et al.* Gliogenic radial glial cells show heterogeneity in the developing mouse spinal cord. *Developmental neuroscience* **27**, 364-377 (2005).
321. Genethliou, N., *et al.* Spatially distinct functions of PAX6 and NKX2.2 during gliogenesis in the ventral spinal cord. *Biochemical and biophysical research communications* **382**, 69-73 (2009).
322. Hochstim, C., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Zhou, Q. & Anderson, D.J. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell* **133**, 510-522 (2008).
323. Zhou, Y.H., Tan, F., Hess, K.R. & Yung, W.K. The expression of PAX6, PTEN, vascular endothelial growth factor, and epidermal growth factor receptor in gliomas: relationship to tumor grade and survival. *Clin Cancer Res* **9**, 3369-3375 (2003).
324. Zhou, Y.H., *et al.* PAX6 suppresses growth of human glioblastoma cells. *J Neurooncol* **71**, 223-229 (2005).
325. Brenner, M., Kisseberth, W.C., Su, Y., Besnard, F. & Messing, A. GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci* **14**, 1030-1037 (1994).

326. Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X. & Gruss, P. Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev* **14**, 2701-2711 (2000).
327. Tuoc, T.C., *et al.* Selective cortical layering abnormalities and behavioral deficits in cortex-specific Pax6 knock-out mice. *J Neurosci* **29**, 8335-8349 (2009).
328. Gould, B.R. & Zingg, H.H. Mapping oxytocin receptor gene expression in the mouse brain and mammary gland using an oxytocin receptor-LacZ reporter mouse. *Neuroscience* **122**, 155-167 (2003).
329. Zhuo, L., *et al.* hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. *Genesis* **31**, 85-94 (2001).
330. Besnard, F., *et al.* Multiple interacting sites regulate astrocyte-specific transcription of the human gene for glial fibrillary acidic protein. *J Biol Chem* **266**, 18877-18883 (1991).
331. Gu, H., Zou, Y.R. & Rajewsky, K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**, 1155-1164 (1993).
332. Reynolds, B.A. & Weiss, S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* **175**, 1-13 (1996).
333. Gotz, M. & Huttner, W.B. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 777-788 (2005).
334. Dyer, M.A. & Cepko, C.L. p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J Neurosci* **21**, 4259-4271 (2001).
335. Kippin, T.E., Martens, D.J. & van der Kooy, D. p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity. *Genes Dev* **19**, 756-767 (2005).
336. Pomerantz, J., *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-723 (1998).

337. Chatoo, W., Abdouh, M., Duparc, R.H. & Bernier, G. Bmi1 Distinguishes Immature Retinal Progenitor/Stem Cells from the Main Progenitor Cell Population and is Required for Normal Retinal Development. *Stem Cells* (2010).
338. Molofsky, A.V., *et al.* Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* **425**, 962-967 (2003).
339. Barry, D. & McDermott, K. Differentiation of radial glia from radial precursor cells and transformation into astrocytes in the developing rat spinal cord. *Glia* **50**, 187-197 (2005).
340. Pringle, N.P., *et al.* Fgfr3 expression by astrocytes and their precursors: evidence that astrocytes and oligodendrocytes originate in distinct neuroepithelial domains. *Development* **130**, 93-102 (2003).
341. Shibata, T., *et al.* Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *J Neurosci* **17**, 9212-9219 (1997).
342. Sauer, B. Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **7**, 2087-2096 (1987).
343. Sauer, B. & Henderson, N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5166-5170 (1988).
344. Gu, H., Marth, J.D., Orban, P.C., Mossmann, H. & Rajewsky, K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* **265**, 103-106 (1994).
345. Akagi, K., *et al.* Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res* **25**, 1766-1773 (1997).
346. Soriano, P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**, 70-71 (1999).
347. Anthony, T.E. & Heintz, N. Genetic lineage tracing defines distinct neurogenic and gliogenic stages of ventral telencephalic radial glial development. *Neural Dev* **3**, 30 (2008).

348. Newman, E. & Reichenbach, A. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* **19**, 307-312 (1996).
349. Bussow, H. The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res* **206**, 367-378 (1980).
350. Schnitzer, J. Astrocytes in mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research* **6**, 209-232 (1988).
351. Stone, J. & Dreher, Z. Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* **255**, 35-49 (1987).
352. Watanabe, T. & Raff, M.C. Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* **332**, 834-837 (1988).
353. Pinon, M.C., Tuoc, T.C., Ashery-Padan, R., Molnar, Z. & Stoykova, A. Altered molecular regionalization and normal thalamocortical connections in cortex-specific Pax6 knock-out mice. *J Neurosci* **28**, 8724-8734 (2008).
354. Zerlin, M., Levison, S.W. & Goldman, J.E. Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain. *J Neurosci* **15**, 7238-7249 (1995).
355. Tuoc, T.C. & Stoykova, A. Trim11 modulates the function of neurogenic transcription factor Pax6 through ubiquitin-proteasome system. *Genes Dev* **22**, 1972-1986 (2008).
356. Garcia, A.D., Doan, N.B., Imura, T., Bush, T.G. & Sofroniew, M.V. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* **7**, 1233-1241 (2004).
357. Herrmann, J.E., *et al.* STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci* **28**, 7231-7243 (2008).
358. Casper, K.B., Jones, K. & McCarthy, K.D. Characterization of astrocyte-specific conditional knockouts. *Genesis* **45**, 292-299 (2007).
359. Slezak, M., *et al.* Transgenic mice for conditional gene manipulation in astroglial cells. *Glia* **55**, 1565-1576 (2007).
360. Holland, E.C., *et al.* Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* **25**, 55-57 (2000).

361. Sonoda, Y., *et al.* Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res* **61**, 6674-6678 (2001).
362. Gibbs, M.E., Hutchinson, D. & Hertz, L. Astrocytic involvement in learning and memory consolidation. *Neurosci Biobehav Rev* **32**, 927-944 (2008).
363. Santello, M. & Volterra, A. Neuroscience: Astrocytes as aide-memoires. *Nature* **463**, 169-170 (2010).

