

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

UMR INRA-CNRS-Université de Tours

Physiologie de la reproduction et des comportements

Microenvironnement et dynamique des réseaux neuroendocriniens

THÈSE présentée par : **Sarah GELLER**

soutenue le : **18 Avril 2013**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : **Sciences de la Vie / Neurosciences**

**Caractérisation des cellules gliales olfactives
associées aux neurones à GnRH-I :
Rôle dans le développement de ces neurones**

THÈSE dirigée par :

Tillet Yves

Directeur de recherche, INRA, Tours-Nouzilly

THÈSE co-encadrée par :

Vaudin Pascal

Maître de conférences, université F. Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Jourdan François

Prévot Vincent

Directeur de recherche émérite, Université de Lyon I, Lyon

Directeur de recherche, INSERM, Lille

JURY :

Jourdan François

Prévot Vincent

Risold Pierre-Yves

Tillet Yves

Vaudin Pascal

Directeur de recherche émérite, Université de Lyon I, Lyon

Directeur de recherche, INSERM, Lille

Chargé de recherche, INSERM, Besançon

Directeur de recherche, INRA, Tours-Nouzilly

Maître de conférences, université F. Rabelais, Tours

*A papilou, manou, babé et pépé,
Au poisson rouge et ses parents
A Dokï et Lodie
A France, vers qui mes pensées se tournent...*

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury : **Francois Jourdan, Pierre-Yves Risold, Vincent prévot, Pascal Vaudin et Yves Tillet** d'avoir consacré un peu de leur temps pour évaluer mon travail de thèse. **Vincent** merci de m'avoir fait découvrir la communication neurone à GnRH et cellules gliales et merci surtout pour votre soutien professionnel.*

Je tiens à remercier mes directrices de thèse.

***Yves**, pour vos corrections, vos conseils et nos discussion scientifique mais également merci votre présence et votre soutien lors de ces derniers mois difficiles*

***Pascal** merci de m'avoir donnée l'occasion de faire cette thèse*

*Je tiens également à remercier **Anne Duittoz** pour nos conversations scientifiques, votre implication dans la correction des articles scientifiques*

*Je remercie également l'ensemble des membres de mon comité de thèse pour leurs conseils: **Joelle Cohen-Tannoudji, Rémi Houlgatte, Anne Duittoz, Pascal Vaudin et Yves Tillet***

*Merci à **Didier Lomet** pour ces trois ans de pcr et ces derniers mois d'histologie, je suis persuadée que ça te manque déjà... merci surtout pour ton soutien moral, nos conversations, ton implication scientifique, ta curiosité bibliographique, pour nos balades à Nantes !*

*Merci à **Monique Ottogali** qui à mon grand regrées est partie beaucoup trop tôt du laboratoire pour se consacrer à ses abeilles, elles en ont de la chance ! Merci de m'avoir appris les dissections de placodes olfactives, merci pour ces deux premières années de thèse, nos conversations, nos mardi philosophie, les vendredis FACS, et plus sérieusement merci pour les fromages de chèvres et le miel*

*Merci à **Alain Caraty** pour l'anticorps qui m'a permis de faire mes triples marquages tant attendus, pour votre implication dans la caractérisation de cet anticorps, merci de m'avoir laissé votre porte grande ouverture et une oreille toujours attentive à mes questions.*

*Une pensée toute particulière à **Isabelle Franceschini** pour nos discussions scientifiques, d'avoir partagé tes connaissances sur les OEC, ta bonne humeur, ton entrain, d'avoir su me rassurer aux moments de stress*

Je souhaite maintenant remercier différentes personnes avec qui j'ai partagées mes doutes, mes déceptions et qui m'ont toujours épaulées dans les moments de bonheur mais également dans les périodes difficiles que j'ai pu traverser pendant cette thèse :

*- **Elodie** pour toutes nos conversations scientifiques riches en émotion mais également pour ton amitié qui a se perdure avec l'éloignement*

*Je tiens à remercier tout particulièrement **Martine Batailler** pour tellement de choses : d'avoir été là, de m'avoir encouragé et soutenu dans les moments les plus dures. Merci pour ces moments de pur délire, pour ton expertise. Je tiens également à te remercier pour tes conseils en histologie, pour la relecture de cette thèse, pour cette motivation et cet entrain scientifique, pour toutes nos conversations...*

*- **Marine** merci pour cette année de colocation qui fut fort sympathique riche en émotion, j'ai su apprécié ton recul et ton sens du stratège, je suis sure que tu t'épanouiras à Poitier...*

*-**Vincent** pour ton soutien, nos conversations, et merci d'avoir été un coach lors des nuits au labo pour le confocal*

*- **Vanessa** pour m'avoir coaché pendant cette rédaction, pour ton aide ton soutien, pour tout ce que tu as pu faire pour moi, MERCI.....J'espère que tu trouveras le poste de tes rêves*

*-**Mathilde, Melanie, Margot**, merci pour votre amitié, votre soutien, pour ces journées au labo, ces soirées au labo, ces nuits au labo, ces we au labo et surtout pour ces appéro pas au labo, ces repas au dehors du labo*

*-Aux amoureux **Vincent et Laura**, merci pour ces explications de word vincent, merci pour tes relectures laure, j'espère que vous trouverez la thèse qui vous correspond*

*-**Anthony** merci de m'avoir soutenu et d'être toujours présent*

Résumé

Chez le mammifère la fonction de reproduction est sous le contrôle des neurones hypothalamiques à GnRH-I. Au cours du développement embryonnaire ces neurones migrent de la fosse nasale vers le cerveau. De nombreuses études s'intéressent aux facteurs impliqués dans leur migration, mais l'influence de leur environnement cellulaire est très peu étudiée. Nous avons émis l'hypothèse que les neurones à GnRH-I d'origine extra-cérébrale possèdent un environnement gliale nécessaire à leur migration, connaissant le rôle de ces cellules dans l'ontogenèse neuronale du cerveau. Nos résultats montrent que 1) les neurones à GnRH-I sont associés à des cellules gliales au cours de leurs migrations nasale et télencéphalique 2) ces cellules gliales sont des progéniteurs des cellules gliales olfactives engainantes qui se différencient dans les régions rostrales au cours de la migration neuronale. 3) ces cellules expriment des gènes codant pour des facteurs impliqués dans la migration de ces neurones. 4) le transcriptome de ces cellules gliales est perturbé en présence d'un perturbateur endocrinien œstrogène-mimétique, et touche des familles de gènes impliquées dans les molécules d'adhésions cellulaires nécessaire à la migration et à la régulation de l'activité des neurones à GnRH-I.

Mots clefs : neurones à GnRH-I, cellules gliales olfactives engainantes, migration, perturbateur endocrinien

Résumé en anglais

GnRH-I cells control reproduction functions in mammals. These cells are extra cerebral since they come from the nasal pit and migrate to the forebrain during embryonic development. Numerous studies have described the influence of different molecules on the migration of GnRH-1 neurons, however, the role of microenvironment cells remains poorly understood. Considering the role of glial cells in the forebrain's neuronal migration, we had hypothesized that extra-cerebral GnRH-I neurons possess a glial environment necessary for their migration from the nose to the brain. Our results demonstrated that 1) GnRH-I neurons are associated with glial cells during their migration in the nasal septum and forebrain 2) These glial cells are progenitors of olfactory ensheathing cells, and differentiated within the rostral regions during neuronal migration. 3) These cells express genes encoding factors involved in GnRH-I neurons migration 4) Glial cells transcriptome are disrupted with estrogen-mimicking endocrine disruptor, and affects gene families involved in cell adhesion molecules necessary for migration and activity regulation of GnRH-I neurons

Keywords : GnRH-I neurons, glial olfactory ensheathing cells, migration, endocrine disruptor

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	5
Résumé en anglais	6
Table des matières	7
Liste des Abréviations	10
Liste des publications	11
Liste des communications affichées	12
Liste des communications orales et séminaires	13
Liste des tableaux	14
Liste des Figures	15
INTRODUCTION	17
I. La GnRH-I et la fonction de reproduction	19
I.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique	19
I.2. L'activité sécrétrice des neurones à GnRH-I et sa régulation	20
II. Le développement du système GnRH-I et du système olfactif	22
II.1. La genèse des neurones à GnRH-I et du système olfactif	22
II.2. La migration des neurones à GnRH-I et la mise en place des nerfs du système olfactif	26
II.3. La différenciation embryonnaire des neurones à GnRH-I	41
II. 3. c. Une période clef dans la différenciation des neurones à GnRH-I : le passage de la lame criblée de l'ethmoïde	43
III. Le système GnRH, une cible des perturbateurs endocriniens à activité œstrogéno-mimétique	44
III.1. Rôle des œstrogènes dans le développement et la régulation du système GnRH-I	44
III.2. Le système GnRH une cible des perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique ou anti-œstrogénique	45
III.3. Le 17 α -éthinyloestradiol et le système GnRH	47
OBJECTIFS	52
RESULTATS	54
Chapitre 1 :Les neurones à GnRH-I en migration sont associés aux cellules gliales olfactives	55
I. Contexte scientifique	55

II. Article 1 : Les cellules gliales olfactives engainantes forment le microenvironnement des neurones à GnRH-I en migration	56
III. Article 2 : Maturation des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I en migration dans le septum nasal.....	58
IV. Conclusion du chapitre I	91
Chapitre 2 :	92
Le transcriptome des cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I est-il modulé par les Perturbateurs Endocriniens ?	92
I. Contexte scientifique	92
II. Matériel et Méthode	95
II.1. Cultures de placodes olfactives GFAP-GFP et traitements au 17- α -éthinyloestradiol	95
II.2. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes codants pour les récepteurs aux œstrogènes en condition contrôle	97
II.3. Procédure de puces à ADN	97
III. Résultats	104
III.1. Les cellules gliales olfactives [GFP+] expriment les gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes.....	104
III.2. Effet d'un traitement de 17- α -éthinyloestradiol sur la survie cellulaire des explants et sur le pourcentage de cellules gliales [GFP+] : Analyse par FACS.....	104
III.3. Effet d'un traitement de 17- α -éthinyloestradiol (EE ₂) sur le transcriptome des cellules gliales [GFP+]	106
IV. Discussion du chapitre III.....	116
IV.1. Les cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I sont une potentielle cible des œstrogènes et des xéno-œstrogènes	116
IV.2. Impact d'un traitement d'EE ₂ et d'E ₂ sur le transcriptome des cellules gliales associées aux neurones à GnRH.....	117
V. Conclusion.....	123
DISCUSSION	124
I. Les neurones à GnRH-I possèdent-ils un environnement glial avant d'entamer leur migration nasale ?.....	125
II. Les cellules gliales olfactives engainantes accompagnent-elles les neurones à GnRH-I dans l'APO et l'hypothalamus ?.....	126

III. Les cellules gliales olfactives engainantes permettent-elles la migration des neurones à GnRH-I ?.....	127
IV. Les cellules gliales olfactives engainantes permettent-elles la différenciation et la régulation de l'activité des neurones à GnRH-I ?	128
V. Ce système est-il dérégulé en présence d'un perturbateur endocrinien ?	129
CONCLUSION.....	131
Bibliographie.....	132
ANNEXE	140

Liste des Abréviations

APO : aire pré-optique	NPN : nerf nasopalatin
AR : récepteurs à androgènes	NT : neurotransmetteurs
BLBP: brain lipid binding protein	OEC : cellules olfactives gliales engainantes
CN : cartilage nasal	ONL: olfactory nerve layer
CNC : crête neural crânienne	OR : récepteurs à odeurs
div: jours de cultures in vitro	PE : perturbateurs endocriniens
E: stade embryonnaire	PO : placodes olfactives
E2 : 17- β -oestradiol	PSA-NCAM : protéine neuronale d'adhésion cellulaire
EE2 : 17- α -éthinyloestradiol	RIN: RNA Integrity Number
EM : éminence médiane	RE : récepteurs à oestrogènes
Enr : enrichissement	SK : syndrome de Kallman
EO : épithélium olfactif	SM : second messenger
ER α : récepteur à l'oestradiol α	SN : septum nasal
ER β : récepteur à l'oestradiol β	T : Témoin
ERE: Estrogen Responsive Element	TF : facteurs de transcriptions
OB: bulbe olfactif	TG : ganglion trigéminal
ESM : écart standard à la moyenne	TGF β : Transforming Growth Factor beta
FACS : Fluorescence activating cell sorting	VN: voméronasal epithelium
FC : facteurs de croissance	VNN: nerfs voméronasaux
FG : facteurs de guidances	VT: vésicule télencéphalique
FSH : follicle stimulating hormone	VNO: organe voméronasal
GFP : green fluorescent protein	
GFAP : glial fibrillary acidic protein	
GnRH : gonadotropin releasing hormone	
LCE : lame criblée de l'ethmoïde	
LH : Luteinizing Hormone	
LP : lamina propria	
Mole. Adh. : Molécule d'adhésion	
NFJ: jonction naso-cérébrale	

Liste des publications

Geller S, Kolasa E, Tillet Y, Duittoz A.H and Vaudin P. **Olfactory ensheathing cells form the microenvironment of migrating GnRH-1 neurons during mouse development.** *Glia*. 2013 Apr;61(4):550-66.

Geller S, Lomet Didier, Tillet Y, Caraty Alain, Duittoz A.H and Vaudin P **Rostral maturation of glial ensheathing cells associated to GnRH-I neurons during mouse development**, *en préparation pour Eur J Neurosci*

Geller S, Desroziers E, Ottogalli M, Lomet D, Georgelin C, Tillet Y, Vaudin P, Franceschini I, Duittoz A.H. GnRH-1 **episodic secretion is modulated by impairment of glial cell to cell communication** *en preparation pour Glia*

Liste des communications affichées

Geller S, Kolasa E, Tillet Y, Duittoz A.H and Vaudin P **Characterization of glial cells during GnRH-1 neurons development.** 8TH FENS Forum of Neuroscience, 14-18 Juillet 2012, Barcelone, Espagne

Geller S, Ottogalli M, Georgelin C, Pillon D, Vaudin P, Duittoz A.H. **L'ethinylestradiol régule l'activité des neurones à GnRH *in vitro* via les récepteurs ERb et GPR30.** 37^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, 28 -30 september 2011, Ville de Québec, Canada

Geller S, Kolasa E, Duittoz A.H and Vaudin P. **Characterization of glial cells during GnRH-1 neurons development.** 2nd joint meeting of French and British Society for Developmental Biology, 3-6 September 2011, Nice, France

Liste des communications orales et séminaires

Sarah Geller : The role of glial cells in GnRH neuron development, invite par le Pr L. Pellerin à la Faculté de biologie et de médecine Département des neurosciences fondamentales, Lausanne, Suisse le 19 septembre 2012

Sarah Geller : Characterisation of glial cells associated to GnRH neurons during migration, 38^{ème} colloque de la société de Neuroendocrinologie, Banyuls sur Mer le 20 Septembre 2012

Sarah Geller : Rôle des astrocytes dans la maturation neuronale de la lignée hypothalamique adulte GnV sécrétant la GnRH, invité par le Pr F. Pralong au Service of Endocrinology, Diabetology and Metabolism, University Hospital and Faculty of Biology and Medicine, Lausanne, Suisse le 24 Novembre 2009

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste de facteurs impliqués dans la migration des neurones à GnRH-I au cours du développement embryonnaire.	36
Tableau 2 : Listes des antigènes exprimés par les cellules olfactives gliales engainantes (OEC), par les cellules Schwann et les astrocytes.	39
Tableau 3 Quantité et qualité du matériel biologique utilisé pour étudier l'effet du 17- α éthinylestradiol sur le transcriptome des cellules gliales olfactives [GFP+].	96
Tableau 4 : Séquences des amorces de RT-PCR des gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes.....	96
Tableau 5 : Tableau des annotations des signalisations biochimiques sous-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 48h à 17nM d'EE ₂ . Enr : Enrichissement.....	109
Tableau 6 : Tableau des annotations fonctionnelles sous-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 48h à 17nM d'EE ₂ . Enr : Enrichissement	109
Tableau 7 : Tableau des annotations fonctionnelles sur-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 48h à 17nM d'EE ₂ . Enr : Enrichissement	111
Tableau 8 : Tableau des annotations des signalisations biochimiques sur-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 48h à 17nM d'EE ₂ . Enr : Enrichissement.....	111
Tableau 9 : Tableau des annotations fonctionnelles sous-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 10jours à 100nM d'E ₂	115
Tableau 10 : Tableau des annotations fonctionnelles sur-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 10jours à 100nM d'E ₂	115

Liste des Figures

Figure 1 : Schémas de cerveau de rongeurs adultes présentant la localisation des neurones à GnRH-I (en vert).	18
Figure 2 : Etapes de la neurulation primaire.	23
Figure 3 : Images de film en « time-laps » illustrant la migration des cellules de la crête neurale (CN, vert) avec les précurseurs de la placode olfactive (PO, rouge).	23
Figure 4 : Schémas du développement de la placode olfactive de souris entre le 10,5 et al 12,5 jours de développement.....	25
Figure 5 : Schémas illustrant la Croissance des axones olfactifs de l'épithélium olfactif (EO) à la vésicule télencéphalique (VT) à l'aide la masse migratoire (mm) chez l'embryon de souris âgés de E10,5 à E12.....	27
Figure 6 : Schéma illustrant l'innervation périphérique et centrale du système olfactif accessoire (orange) et du système olfactif principale (violet) chez le rongeur adulte.	29
Figure 7 : Schéma du système voméronasal chez le rongeur.....	29
Figure 8 : Mise en culture et développement des explants de placodes olfactives de souris...	30
Figure 9 : Migration des neurones à GnRH-I au cours du développement embryonnaire chez la souris.	33
Figure 10 : Représentation de la molécule du 17 β -œstradiol et du 17 α -éthinyloestradiol.....	48
Figure 11 : Gammes de concentrations de 17 α -éthinyloestradiol retrouvées dans les eaux de différents pays et dans les traitements hormonaux. Adapté de Pilon et al 2012.....	48
Figure 12 : Schéma représentant les voies moléculaires utilisé par les récepteurs à l'œstradiol (ER et GPR30) après fixation de leur ligand.....	50
Figure 13 : Schéma général des études menées dans le chapitre 3	94
Figure 14 : Segments d'un électrophérogramme (<i>Scroeder 2006</i>).....	98
Figure 15 : Etapes d'analyses primaires des puces à ADN.....	103
Figure 16 Expression des gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes par les cellules gliales olfactives GFAP-GFP.	105
Figure 17 : Analyses des cultures d'explants de placodes olfactives par FACS. (A-B) échantillons est représentée par un trait. Les cultures ont soit été traitées à l'EE ₂ pendant 48h EE ₂ (48h) ou pendant 10jours EE ₂ (10j) ; soit traitées à l'œstradiol pendant 10 jours E ₂ (10j). T(48h) et T(10j) représentent les témoins respectifs	105

Figure 18 : Matrice de sondes illustrant le différentiel d'expression des échantillons de cellules gliales [GFP+] traitées pendant 48h à l'EE2 par apport aux échantillons témoins.	108
Figure 19 : Matrice de sondes illustrant le différentiel d'expression des échantillons de cellules gliales [GFP+] traitées pendant 10 jours à l'EE ₂ et à l'E ₂ par apport aux échantillons témoins.	113

INTRODUCTION

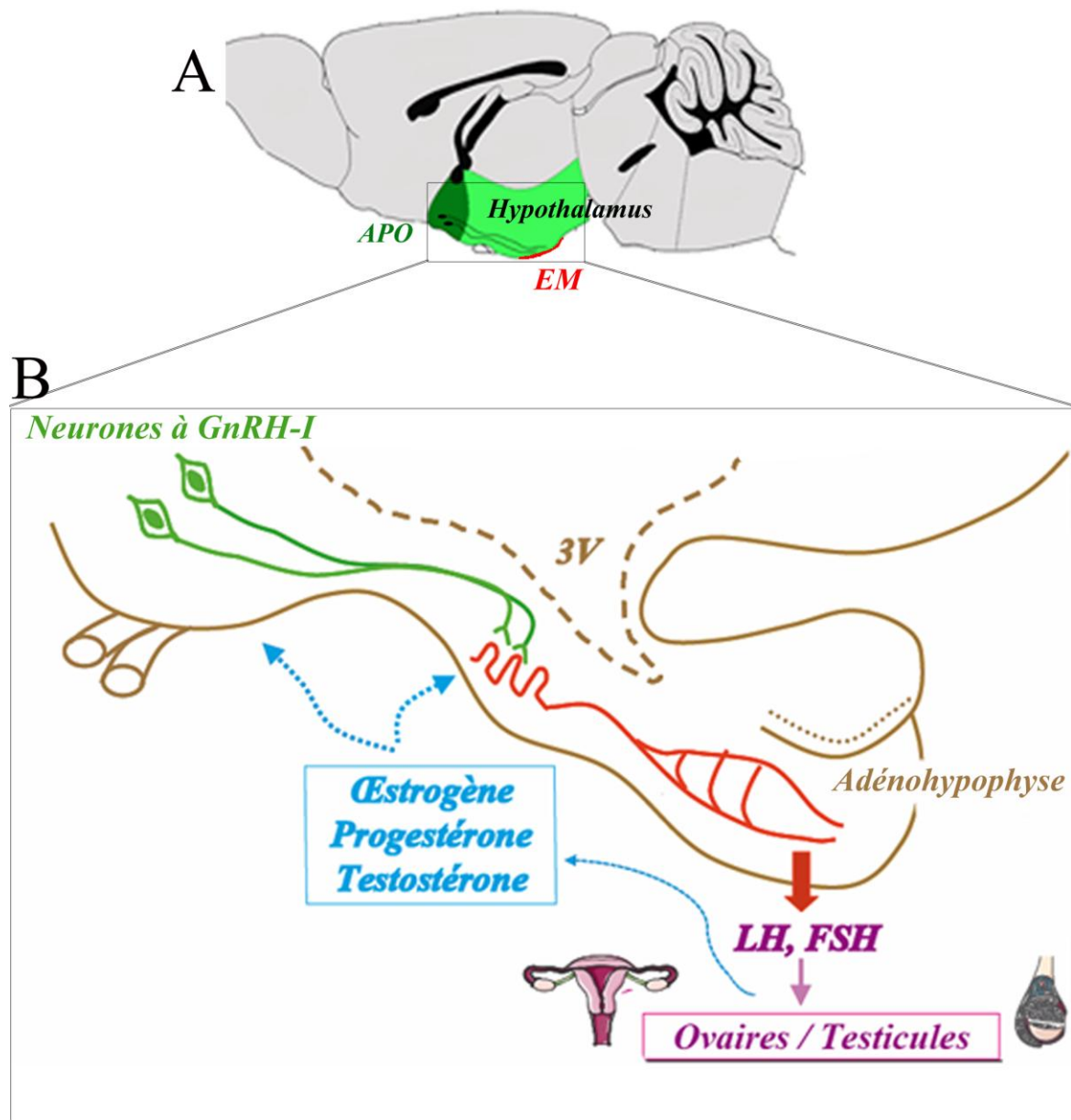


Figure 1 : Schémas de cerveau de rongeurs adultes présentant la localisation des neurones à GnRH-I (en vert). A. Coupe sagittale d'un cerveau de rongeur adulte, illustrant l'aire pré-optique (APO) en vert foncé, l'hypothalamus en vert claire et la base de l'éminence médiane (EM) en rouge B. Agrandissement schématique d'une coupe sagittale d'hypothalamus : le système porte hypophysaire est représenté en rouge. 3V : 3^{ème} ventricule.

I. La GnRH-I et la fonction de reproduction

Chez les mammifères, la fonction de reproduction est sous le contrôle d'un décapeptide, la gonadolibérine de type I ou GnRH-I (Gonadotropin-Releasing Hormone). Chez les vertébrés trois types de formes de GnRH codés par des gènes différents et présentant des variations des séquences d'acides aminés ont été décrit (Okubo et Nagahama 2008) : le GnRH-I, le GnRH-II et le GnRH-III. Le GnRH-II dit de poulet représente la forme la plus ancienne (Sherwood et al 1993). Il est exprimé dans beaucoup d'espèces à la frontière entre le diencephale et le mésencéphale (Volkoff et al 1999) mais n'est pas toujours activé chez les mammifères (Okubo et Nagahama 2008). Le GnRH-III présent uniquement chez le poisson téléostéen contrôle la fonction de reproduction chez certaines espèces comme le zebrafish (Steven et al 2003). Les neurones qui produisent la GnRH-I et III sont d'origines extra-cérébrales. Ils sont issus de la fosse nasale et migrent pendant le développement embryonnaire dans le cerveau (Wray et al 1989, Schwanzel-Fukuda 1989, Abraham et al 2008).

I.1. L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique

Les neurones à GnRH-I sont des neurones hypothalamiques dont leurs corps cellulaires sont distribués de manière diffuse dans la région septo-préoptique chez les rongeurs (qui regroupe le septum médian et l'aire préoptique APO) (Figure 1) (Baker and Yu 1976; Gross 1976; Witkin et al. 1982) et l'hypothalamus médio-basal chez les primates. Leurs axones se projettent à plus de 70% dans l'éminence médiane formant une voie hypothalamo-hypophysaire (Baker and Yu 1976; Gross 1976; Witkin et al. 1982) (Figure 1).

La GnRH-I est sécrétée sous forme de très courts épisodes de sécrétion, appelés pulses, dans les vaisseaux portes hypothalamo-hypophysaires situés au sein de l'éminence médiane (EM) (Clarke 2011). La GnRH-I est ensuite transportée par le sang porte-hypothalamo-hypophysaire vers les cellules de l'hypophyse antérieure, où elle induit la libération des hormones gonadotropes, LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Folliculo Stimulating Hormone) (Clarke 2011). Ces deux hormones, en agissant sur les cellules cibles des testicules et ovaires, induisent la gamétogenèse et la stéroïdogenèse. Les cellules de GnRH-1 sont donc une partie intégrante de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG) (**Figure 1**).

I.2. L'activité sécrétrice des neurones à GnRH-I et sa régulation

La pulsatilité de la sécrétion de GnRH-I est une caractéristique essentielle à sa fonctionnalité.

Cette sécrétion est induite par une activité rythmique endogène des neurones à GnRH-I qui est associée avec une synchronisation de l'activité neuronale. En effet une sécrétion pulsatile sous-entend que chaque neurone ait une activité pulsatile de sécrétion et que au moins une partie des neurones soient synchrones pour donner un pulse. Deux paramètres essentiels permettent de définir la sécrétion pulsatile :

- La fréquence d'apparition du pulse qui est déterminée à partir des intervalles inter-pulse. Cette fréquence est spécifique à chaque espèce, elle est de ~50 minutes chez le mouton (Duittoz and Batailler 2000) et le primate (Terasawa et al. 1999), ~30 minutes chez le rat (Funabashi et al. 2000) et ~20 minutes chez la souris (Constantin et al. 2009).

- L'amplitude des pulses qui correspond aux taux maximal d'hormone détecté auquel est soustrait le niveau de GnRH de base. Ce paramètre est essentiel pour la survenue du pic pré-ovulatoire de GnRH, et donc de LH (Levine and Ramirez 1982)

La machinerie intracellulaire responsable de cette sécrétion pulsatile n'est pas clairement définie, cependant il a été mis en évidence une corrélation entre la synchronisation des oscillations calciques et les « pulses » de GnRH-I chez le primate (Terasawa et al. 1999) et chez la souris (Constantin et al. 2009)

Toute modification des paramètres de sécrétions au niveau hypothalamique peut se traduire par des troubles du déclenchement de la puberté, un hypogonadisme, ou encore des troubles de la fertilité pouvant aller jusqu'à l'infertilité (Lopez et al. 1998). Chez la femelle, la sécrétion de GnRH-I est également caractérisée par une fluctuation au cours de la vie reproductive (période pré-pubère, cycle oestrien, reprise de la reproduction chez les animaux saisonniers).

Cette rythmicité endogène des neurones à GnRH-I est sous l'influence de multiples contrôles hormonaux et cellulaires. Ces neurones reçoivent des informations :

- i) par voie humorale, en particulier des hormones stéroïdiennes gonadiques, dont l'œstradiol (Herbison 1998),

- ii) par voie nerveuse, au niveau des corps cellulaires des neurones à GnRH-I par des afférences de neurones à GABA, à NPY, à Galanine mais aussi au niveau des terminaisons nerveuses à GnRH-I par des neurones dopaminergiques (Herbison 1998). Ces dernières

60 années il a également été mis en évidence la régulation de l'activité des neurones à GnRH-I
61 par les neurones à Kisspeptine au niveau de l'APO (Patterson et al 2004) et de l'éminence
62 médiane (d'Anglemont de Tassigny et al. 2008)

63 iii) par des communications impliquant des cellules non neuronales telles que les cellules
64 gliales astrocytaires au niveau de la région préoptico-septale et les cellules épendymocytes
65 tanycytaires, qui bordent le troisième ventricule au niveau de l'éminence médiane (Prevot et
66 al. 2007). En effet plusieurs études mettent en évidence l'implication des facteurs
67 astrocytaires dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH-I, tel que l'IGF-1 (Insuline
68 Growth Factor type 1) (Hiney et al, 1996), le bFGF (Basic Fibroblast Growth factor) (Galbiati
69 et al. 2001) (Galbiati et al. 2002) (Ojeda et al. 2003), la PGE₂ (Prostaglandine E₂) (Barres et
70 al, 1991), et le TGFβ (Transforming Growth Factor beta) (Melcangi et al. 1995) (Galbiati et
71 al. 1996).

II. Le développement du système GnRH-I et du système olfactif

II.1. La genèse des neurones à GnRH-I et du système olfactif

II. 1. a. La double origine des neurones à GnRH-I et du système olfactif

Il y a 24 ans, deux groupes ont mis en évidence l'origine extra-cérébrale des neurones à GnRH-I chez la souris : ces neurones hypothalamiques migrent de la placode nasale au CNS (Schwanzel-Fukuda and Pfaff 1989; Wray et al. 1989b). Depuis, la migration des cellules GnRH-I et, chez le poisson des cellules GnRH-III, a été documentée pour de nombreuses espèces (Caldani et al. 1995; Daikoku-Ishido et al. 1990; Ronnekleiv and Resko 1990) (Mulrenin et al. 1999; Steven et al. 2003). Cependant, la localisation des précurseurs de ces neurones endocrine n'a été élucidée que récemment. En effet une étude publiée au cours de ma thèse a mis en évidence que ces neurones possédaient une double origine. A partir de deux lignées de souris transgéniques complémentaires, de traçage génétique *Rosa Cre-lox*, le groupe du Dr Susan Wray a démontré que 70% des neurones à GnRH-I provenaient de la placode olfactive (PO), tandis que 30% étaient originaires de la crête neurale crânienne (CN) (Forni et al. 2011b).

La crête neurale est un type cellulaire embryonnaire unique au vertébré qui dérive du neuro-ectoderme et qui se trouve à la jonction entre la plaque neurale et l'ectoderme non neural (épiderme) (**Figure 2**) (Baker and Bronner-Fraser 1997). Après le stade de neurulation primaire, ces cellules de la CN se placent centralement entre le tube neural et l'épiderme (**Figure 2**). Au stade précoce du développement, les cellules de la crête neurale subissent 2 vagues de migrations, une ventrale puis une dorsale. Cette seconde vague, qui a lieu du 6^{ème} jour de développement embryonnaire (E6,5) au 9,5 chez la souris, formera une partie de la masse cellulaire nécessaire au développement du système olfactif (Baker et al. 1997).

La placode olfactive est un épaississement local et transitoire de l'ectoderme qui provient de la plaque neurale, qui se fait par une convergence rostrale de cellules de part et d'autre du télencéphale en développement, autour de E9,5 chez la souris (**Figure 3**) (Forni et al. 2011b; Harden et al. 2012; Whitlock and Westerfield 2000). La formation de la placode olfactive s'accompagne d'une migration rostrale des cellules de la crête neurale qui vont entourer la placode olfactive (**Figure 3**) (Harden et al. 2012). Ainsi les deux domaines, crête neurale et placode olfactive, vont être étroitement associés ; certains les considérant adjacents, à la limite d'une mixité ((Harden et al. 2012; Whitlock and Westerfield 2000), tandis que d'autres

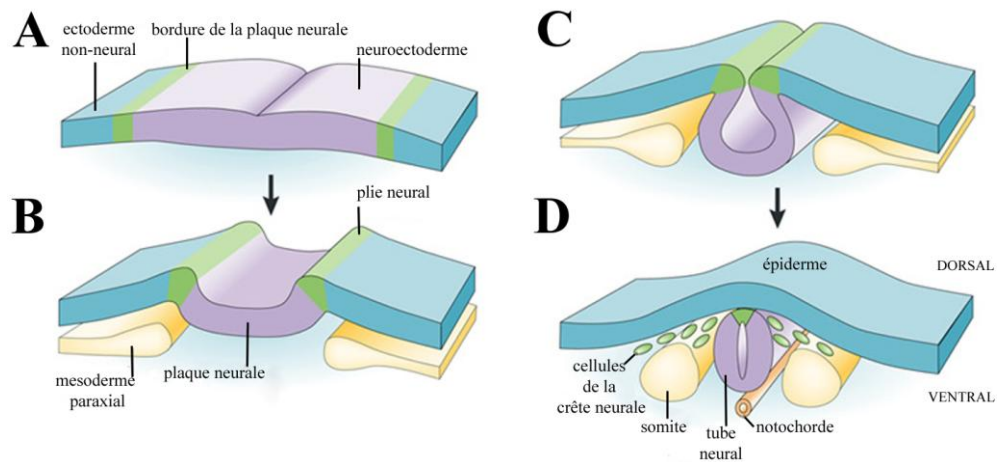


Figure 2 : Etapes de la neurulation primaire. (A) La frontière de la plaque neurale (vert) est induite par la signalisation entre le neuroectoderme (violet), l'ectoderme non neural (bleu) et le mésoderme paraxial sous-jacente (jaune). (B-D) Au cours de la neurulation, les frontières de la plaque neurale se plissent (B-C), permettant la formation du tube neural (violet) (D). Les cellules de la crête neurale (vert) se décollent de la partie dorsale du tube neural et migrent d'abord ventralement (1ère vague) puis dorsalement (2^{ème} vague) (D). Adapté de Laura S. et al 2003

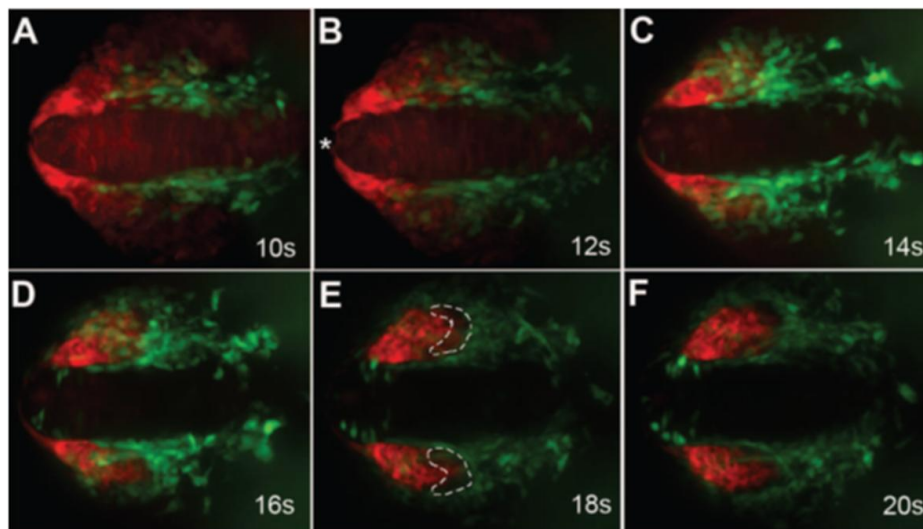


Figure 3 : Images de film en « time-laps » illustrant la migration des cellules de la crête neurale (CN, vert) avec les précurseurs de la placode olfactive (PO, rouge). (A) Au stade 10 somites, les précurseurs de la PO (rouge) sont enroulés autour de l'extrémité rostrale du tube neural (médian). (B) les précurseurs de la PO s'éloignent de la ligne médiane rostrale (astérisque), et les CN (vert) migrent rostralement. (C) Les CNC commencent à entourer le bord postérieur des précurseurs de la PO. (D) A 16 somites les précurseurs de la PO ne sont plus détectés à l'extrémité du tube neural. Les cellules de la CN (vert) arrivent à la limite antérieure des PO (E) A 18 somites, les cellules de la CN (vert) ont migré vers la limite rostrale des placodes olfactifs. La région postérieure de la placode olfactive contient ni de cellules vertes, ni rouges (contour blanc). (F) A la fin du film, les placodes olfactives sont complètement formées. Embryons de poulet en vues dorsales, (*) : partie rostrale. (Harden et al 2012)

considéreront un envahissement de la PO par les cellules de la crête neurale (Barraud (Barraud et al. 2010; Forni et al. 2011b)). Quoiqu'il en soit, l'ensemble s'invagine pour former la fosse nasale entre E10 et E10,5 chez la souris (Cuschieri and Bannister 1975) (**Figure 4**). Dès E11,5, se forment respectivement l'épithélium olfactifs (EO) et l'épithélium voméronasal (VN) dans la partie latérale et médiale du nez (**Figure 4**). Ainsi ces épithéliums possèdent également une double origine, la crête neurale et la placode olfactive (Forni et al. 2011b).

II. 1. b. La neurogenèse olfactive et la neurogenèse des neurones à GnRH

1. La période neurogénique olfactive

La naissance des neurones à GnRH-I est un des premiers événements neurogéniques dans la fosse nasale en développement (Forni et al 2010). Elle se fait dans une fenêtre de temps courte et limitée contrairement aux neurones voméronasaux/olfactifs (Forni et al. 2011a; Murdoch and Roskams 2007; Murdoch and Roskams 2008; Wray et al. 1989a). En effet, la neurogenèse olfactive à partir de précurseurs multipotents se fait entre E9,5 et P0 chez la souris (Murdoch and Roskams 2007); tandis que les neurones à GnRH-I naissent pendant le développement et la différenciation de la fosse nasale, entre E9,5 et E12,5 (Wray et al. 1989a,(Jasoni et al. 2009). Les dernières divisions mitotiques des précurseurs se font majoritairement (80%) entre E9,5 et E10,5 (Wray et al. 1989a,(Jasoni et al. 2009)et les neurones commencent à exprimer la GnRH-I 48h à 72h après leurs mitoses dans l'ébauche du VNO ou en cours de migration (Forni et al. 2011b).

2. Les inducteurs de la neurogenèse des neurones à GnRH-I

Dans la fosse nasale en développement plusieurs inducteurs neuronaux ont été mis en évidence : latéralement l'acide rétinoïque, postérieurement le BMP4 (bone morphogenetic protein 4) et médialement le FGF8 (fibroblast growth factor 8) et SHH (Sonic hedgehog) (LaMantia et al. 2000).

En ce qui concerne les neurones à GnRH-I, la signalisation FGF et tout particulièrement le facteur trophique FGF8 et son récepteur FGFR1, sont essentiels pour la formation de ces neurones (Chung et al. 2008). En effet la perte d'expression de *Fgf8* a comme conséquence l'absence de formation de neurones à GnRH-I mais également du VNO (Chung et al. 2010), qui s'explique par l'implication du FGF8 dans l'induction et la différenciation de la placode nasale de souris (Kawauchi et al. 2005).

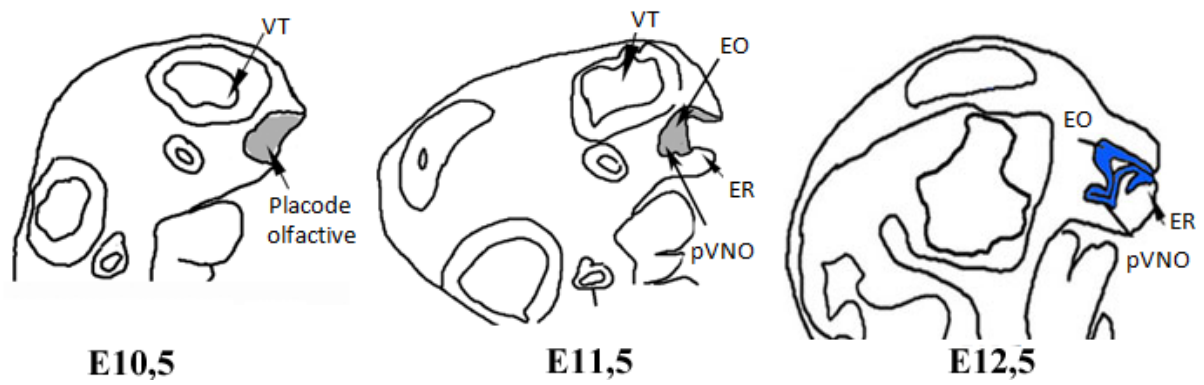


Figure 4 : Schémas du développement de la placode olfactive de souris entre le 10,5 et al 12,5 jours de développement. La placode olfactive s'invagine et forme l'épithélium respiratoire (ER), l'organe voméronasal présumé (pVNO) et l'épithélium olfactif (EO). VT : vésicule télencéphalique. *Adapté de Wray S. 2010*

Récemment il a été mis en évidence le rôle de CHD7 (chromodomain helicase DNA binding protein 7) dans la prolifération des progéniteurs des neurones à GnRH-I et dans la neurogenèse de ces neurones, en régulant l'expression de *Fgfr1* et *Bmp4* (Layman et al. 2011).

Enfin il a également été décrit le rôle de FE65, une protéine de liaison aux précurseurs de la protéine amyloïde (APP), dans le contrôle de la neurogenèse des neurones à GnRH-I (Forni et al. 2011a). Le FE65 est fortement exprimé par les cellules post-mitotiques du VNO présomptif dont les neurones à GnRH-I à partir d'E11, en fin de période de la neurogenèse de ces derniers. Cette protéine de liaison à l'APP exerce une fenêtre d'action neurogénique restreinte dans le temps sur les progéniteurs multipotents des neurones à GnRH-I au sein de la placode nasale en développement. Ainsi les souris déficientes en FE65 présentent une augmentation du nombre de neurones voméronasaux/olfactifs et une augmentation de 25% des neurones à GnRH-I.

II.2. La migration des neurones à GnRH-I et la mise en place des nerfs du système olfactif

II. 2. a. La mise en place des voies de migration des neurones à GnRH-I

1. La masse migratoire

La migration nasale des neurones à GnRH-I est décrite comme un exemple de migration tangentielle (Wray 2010) qui dépend de la formation des voies de migration, c'est-à-dire des nerfs du système olfactif (Miller et al. 2010).

Les premiers axones commencent à traverser la lamina propria dans le mésenchyme nasal à partir de E10-E11 (Cuschieri and Bannister 1975; Miller et al. 2010) et pénètrent la vésicule télencéphalique dès E11,5-E12 (Cuschieri and Bannister 1975; Doucette 1989; Miller et al. 2010) et al 2010) associées à une masse cellulaire en migration (**Figure 5**) (Marin-Padilla and Amieva 1989) (Valverde et al. 1992).

Cette masse migratoire (Valverde et al. 1992) est composée au centre de précurseurs neuronaux originaires de la PO (Blanchart et al. 2011; Miller et al. 2010) qui vont se différencier en cellules OMP+ (olfactory marker protein) (Farbman et al. 1998) (Valverde et al. 1993), en cellules à acétylcholinestérase (AChE) (De Carlos et al. 1995), en neurones à GnRH-I (Schwanzel-Fukuda and Pfaff 1989; Wray et al. 1989b), en neurones synthétisant le GABA (Tobet et al. 1996a; Wray et al. 1996), en neurones synthétisant le

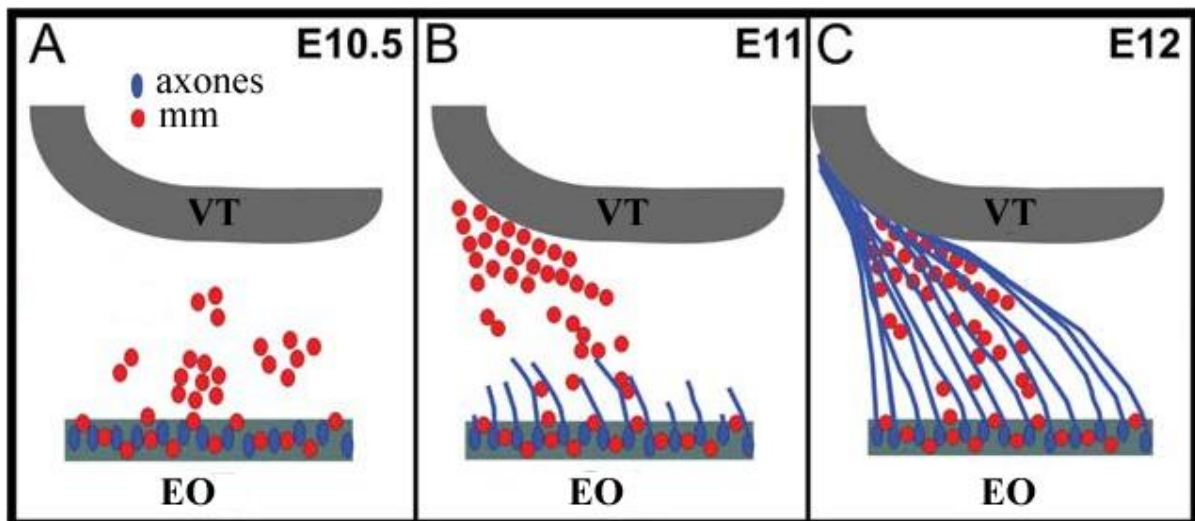


Figure 5 : Schémas illustrant la Croissance des axones olfactifs de l'épithélium olfactif (EO) à la vésicule télencéphalique (VT) à l'aide la masse migratoire (mm) chez l'embryon de souris âgés de E10,5 à E12. Adapté de Miller et al 2010

(Verney et al. 1996), en neurones à NPY (Hilal et al. 1996), en neurones à Galanine (Key and Wray 2000), dont les marqueurs peuvent être exprimés transitoirement dans des neurones à GnRH-I. En périphérie, la masse migratoire est composée de précurseurs gliaux originaires de la CNC et qui vont se différencier en cellules olfactives engainantes (OEC) (Doucette 1989) (Blanchart et al. 2011; Miller et al. 2010) (Forni et al. 2011b).

2. Les trajets des nerfs olfactifs, voméronasaux et du nerf terminal

La masse migratoire est un poste de guidage indispensable à la croissance axonale des neurones olfactifs et voméronasaux (De Carlos et al. 1995). Ainsi, elle permet latéralement l'extension des axones olfactifs de l'épithélium olfactif aux glomérules du bulbe olfactif principal en formant la couche de nerf olfactif (ONL : olfactory nerves layers) ventro-latéralement aux bulbes olfactifs, au niveau de la jonction entre le septum nasal et les bulbes (**Figure 6**). Médialement elle permet l'extension des axones voméronasaux du VNO au bulbe olfactif accessoire, en empruntant une voie médio-dorsale (**Figure 6 et Figure 7**).

Elle permet également la formation du nerf terminal, un composant du système olfactif accessoire. Ce nerf ganglionnaire est une structure originaire de la PO, composée de chaînes de neurones à GnRH-I, à NPY, et à AChE (Schwanzel-Fukuda et al. 1985) (Caldani et al. 1987; Oelschlager 1988; Schwanzel-Fukuda and Silverman 1980; Zheng and Jourdan 1988). Le nerf terminal se projette de la lamina propria, au niveau de la sortie de l'épithélium du VNO jusqu'au diencéphale (**Figure 7**) (Wirsig-Wiechmann and Oka 2002). Chez les mammifères, la projection centrale de ce nerf n'est pas bien définie, des études de traçage montrent clairement qu'il traverse la surface ventro-médiale du BO, puis la région olfactive rostrale et le septum (Wirsig-Wiechmann and Oka 2002) et postérieurement à l'amygdale (Jennes 1987). Wray et al. (1989b) considèrent qu'il se projette jusque dans l'aire pré-optique cependant il est difficile de distinguer dans cette région le nerf terminal des projections des neurones à GnRH-I (Wirsig-Wiechmann and Oka 2002).

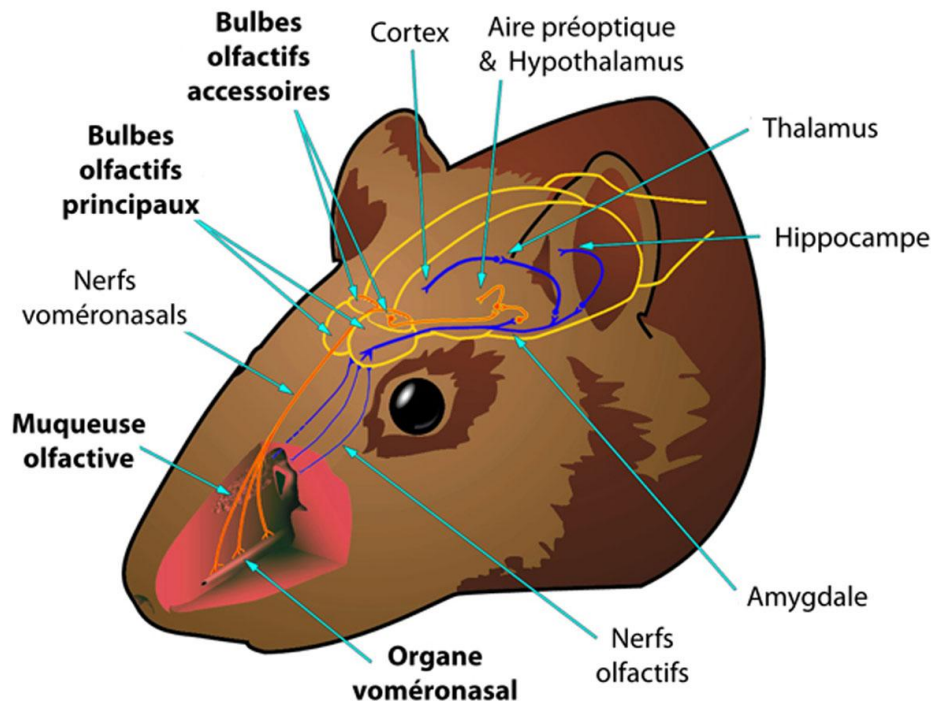


Figure 6 : Schéma illustrant l'innervation périphérique et centrale du système olfactif accessoire (orange) et du système olfactif principale (violet) chez le rongeur adulte.

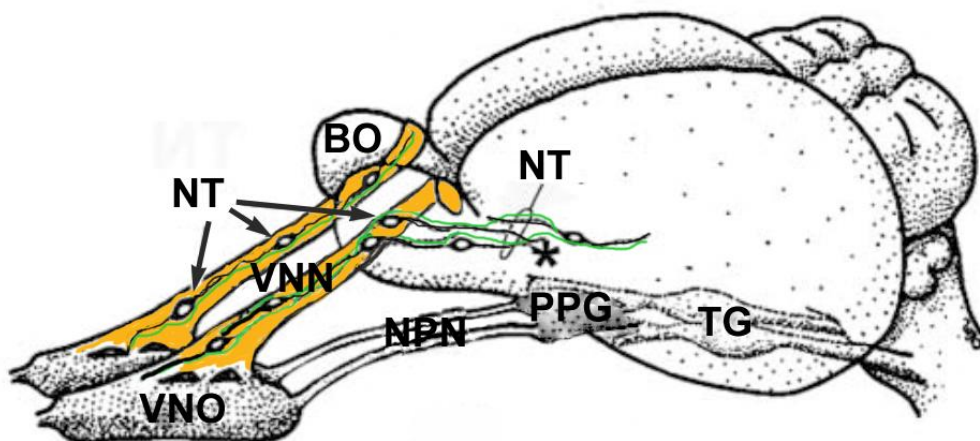


Figure 7 : Schéma du système voméronasal chez le rongeur. En noir sont représentés les corps cellulaires et les prolongements des neurones à GnRH-I qui composent le nerf terminal (NT vert), le long des nerfs voméronasaux (VNN, jaune), de la sortie de l'organe voméronasal (VNO) au cerveau. NPN : nerf nasopalatin, PPG : ganglion pterygopalatin, TG : ganglion trigeminal. *Adapté de Wirsig 2011*

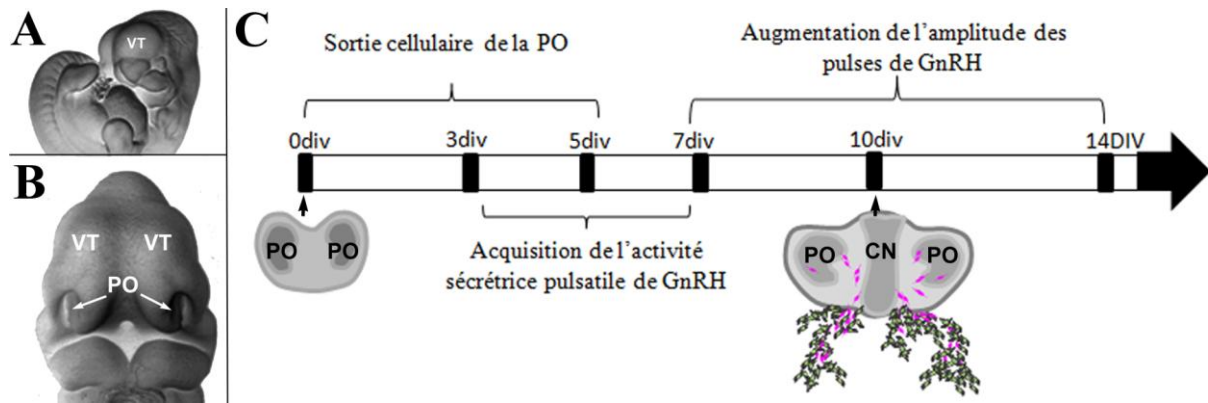


Figure 8 : Mise en culture et développement des explants de placodes olfactives de souris. (A-B) embryons de souris âgés de E11,5, (A) vue sagittale de l'embryon, (B) vu frontale de la tête de l'embryon (C) Etapes de développements des cultures d'explants de placodes olfactives (PO), de la mise en culture (0div) jusqu'à 14 jours de développement *in vitro* (div), d'après les données de Fueshko et Wray 1994 et de Constantin et al 2009. VT : vésicule télencéphalique, CN : cartilage nasal.

II. 2. b. La migration des neurones à GnRH-I

1. Caractéristiques de la migration des neurones à GnRH-I à partir du modèle d'explant de placodes olfactives

La migration des neurones à GnRH-I est bien documentée depuis plus de vingt ans à partir d'analyses immunohistochimiques sur des coupes de têtes d'embryons (Schwanzel-Fukuda and Pfaff 1989; Wray et al. 1989b). Depuis elle a été analysée en utilisant la microscopie en temps –accéléré (time-lapse) sur des tranches d'embryons de souris (Bless et al. 2005; Tobet et al. 1996b) et sur des explants nasaux de placodes olfactives (Casoni et Wray 2008).

Le modèle de culture d'explants de placodes olfactives est développé depuis 20 ans chez la souris le primate et le mouton (Fueshko and Wray 1994; Terasawa et al. 1993) (Duittoz et al. 1997). Cette approche se base sur l'origine extra-cérébrale des neurones à GnRH-I. Les placodes olfactives sont disséquées et mises en culture lorsque les neurones à GnRH-I n'ont pas encore entamé leur migration, soit à E11,5 chez la souris (**Figure 8**). Les cellules migrent depuis la partie médiane de la placode olfactive vers l'extérieur de l'explant. Il a été estimé que ce modèle de culture maintient 20 à 50% (160-400 neurones) du nombre total de la population de neurones à GnRH-I (Fueshko and Wray 1994). De plus les étapes de développement *in vitro* (div) sont relativement standardisées et présentent beaucoup de caractéristiques communes avec celles décrites *in vivo* (Fueshko and Wray 1994). A 3div les neurones à GnRH-I émergent sur le plan dorso-ventral de l'explant et après 5div une continuité de neurones à GnRH-I migre bilatéralement de la PO, à travers la masse du tissu de l'explant, jusqu'au substrat cellulaire qui compose l'environnement extérieur de l'explant. L'émergence bilatérale des neurones à GnRH-I se fait en étroite association avec les nerfs voméronasaux, qui forment un long rail dès la sortie de la PO. Les signaux moléculaires qui permettent d'initier la migration et de maintenir une migration bidirectionnelle sont donc intacts dans ce système de culture. Les neurones à GnRH-I parcourent *in vitro* une distance moyenne de 0,4mm, ce qui correspond *in vivo* à la traversée de la région olfactive des neurones à GnRH-I. *In vivo* les neurones à GnRH-I parcourent du voméronasal à l'APO une distance comprise entre 0,5mm et 1mm entre E11,5 et E13,5 (Fueshko and Wray 1994).

Les études réalisées à partir de ces modèles *ex vivo* et *in vitro*, ont permis de mettre en évidence que la vitesse et les mouvements de ces neurones à GnRH-I extra-cérébraux sont semblables à la migration des cellules dans le système nerveux central :

i) la migration des neurones à GnRH-I fait appel à une extension des neurites, avec une nucléokinèse associée à une translocation du soma et présente un mouvement saltatoire (Casoni et al 2008)

ii) Les neurones à GnRH-I migrent dans la région du nez à une vitesse de 13-20 $\mu\text{m/h}$ ((Tobet et al. 1996b) (Casoni et al 2008), de manière semblable aux neurones corticaux qui utilisent de la glie radiaire (Wray 2010).

2. Le chemin de migration des neurones à GnRH-I

Le trajet de migration des neurones à GnRH-I a été décrit pour la première fois par Schwanzel-Fukuda et al (1989) et Wray et al (1989b) sur le modèle murin. Plusieurs étapes peuvent être identifiées (**Figure 9 A et B**):

- i) La migration intra-mésenchymale de la fosse nasale à la lame criblée de l'ethmoïde (LCE) commence chez la souris entre E12,5 et E13,5. Les neurones forment un trajet migratoire au sein du septum nasal (SN), médialement, de part et d'autre du cartilage nasale en développement, jusqu'à la jonction entre le SN et le cerveau. Cette étape initiale requiert le mouvement des neurones à GnRH-I et des facteurs spécifiques qui favorisent l'adhérence des neurones aux axones des nerfs voméronasaux (Wierman et al. 2010; Wray 2002).
- ii) Le passage de la lame criblée de l'ethmoïde, au niveau de la jonction entre le nez et le cerveau, est caractérisé par un ralentissement de ces neurones (Wray 2002). La raison de cette pause n'est pas clairement définie. Elle pourrait être due à un changement de la composition du milieu extracellulaire et pourrait impliquer une différenciation des neurones à GnRH-I nécessaire pour appréhender/entamer leur migration cérébrale. Au niveau de cette jonction les neurones à GnRH-I convergent vers des racines centrales du nerf terminal et tournent caudalement dans le cerveau.

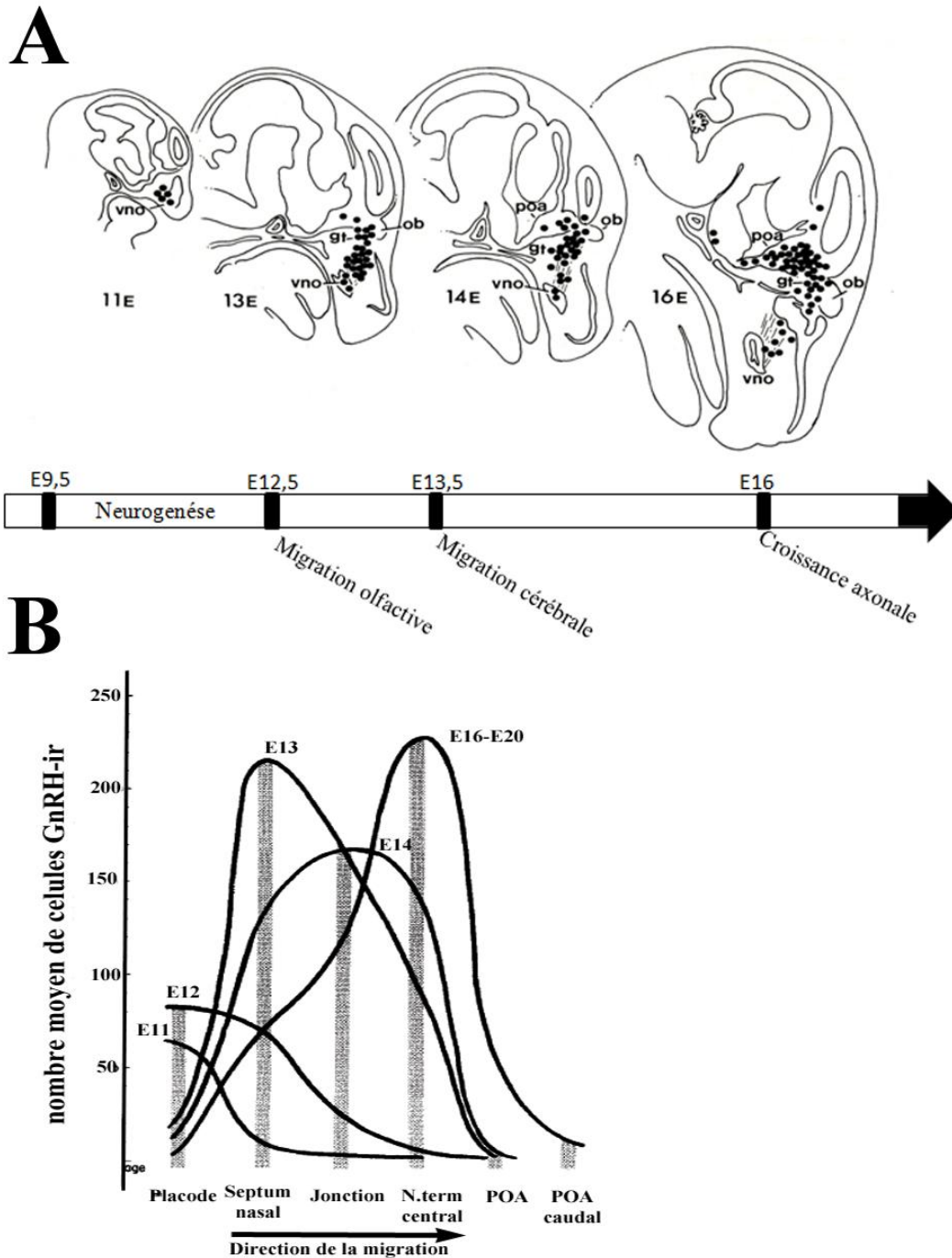


Figure 9 : Migration des neurones à GnRH-I au cours du développement embryonnaire chez la souris. (A) Schémas représentant le développement des neurones à GnRH-I du 10,5 au 16 jours de développement embryonnaire (E10,5 à E16). Les points noirs représentent les neurones à GnRH-I. (B) Schéma résumant la progression des neurones à GnRH-I de la placode olfactive à la partie caudale de l'aire pré-optique (POA). Les bâtons représentent le nombre de cellules GnRH-ir dans chaque zone étudiée (la placode, le septum nasal, la jonction entre le nez et le cerveau, la partie centrale du nerf terminal, la POA proximale et distale) et à chaque stade étudié (de E11 à E16-E20). Les courbes noires précisent l'organisation de l'ensemble des cellules à ces stades. Adapté de Schwanzel-Fukuda et al 1989

iii) La migration intracérébrale vers la région pré-optico-septale est entamée par les neurones à GnRH-I à E13,5. A ce stade, les neurones ont envahi le télencéphale (la partie centrale du nerf terminal) et ont atteint la partie rostrale du diencéphale. Plusieurs études ont montré que les neurones à GnRH-I augmentent leur vitesse de migration dans le cerveau et présentent des trajets de migration diffus (Bless et al. 2005; Tobet et al. 1996b). Au niveau de la région pré-optico-septale les neurones se détachent de leurs guides axonaux et se dispersent dans l'hypothalamus et arrêtent de migrer. A E16,5 la distribution des neurones à GnRH-I au sein du cerveau est similaire à celle d'une souris adulte et les premières fibres GnRH-I atteignent l'éminence médiane.

II. 2. c. La régulation de la migration des neurones à GnRH-I

Les données sur la migration des neurones à GnRH-I sont axées sur les mécanismes moléculaires qui permettent aux neurones de migrer selon une trajectoire déterminée (Wierman et al. 2010; Wray 2002; Wray 2010).

Beaucoup de molécules/récepteurs sont exprimés par les neurones à GnRH-I en migration du nez au cerveau (**Tableau 1**). Ces neurones vont migrer spatialement et temporellement à travers plusieurs zones, le septum nasal, la lame criblée de l'ethmoïde et le cerveau, qui produisent des molécules de guidance différentes (**Tableau 1**) :

- des molécules d'adhésion inter-cellulaires, qui associent les neurones à GnRH-I à la partie rostrale des nerfs voméronasaux et des faisceaux de neurones du nerf terminal. Ces molécules comprennent les formes polysialées des protéines neuronales d'adhésion cellulaire (PSA-NCAM) mais aussi l'anosmin-1, le produit du gène *Kal-1*. La mutation de ce gène, absent dans le génome des rongeurs, a été mise en évidence chez l'Homme dans le syndrome de Kallmann ou hypogonadisme-hypogonadotrope-anosmique qui se traduit par l'absence de puberté et d'odorat à l'âge adulte, dû à un défaut de migration des neurones à GnRH-I et des axones olfactifs (MacColl et al. 2002; Schwanzel-Fukuda et al. 1989)

Molécule/ Récepteur	Classification	Système ciblé	Lieu d'action	Pathologie humaine
PSA-NCAM (neural cell adhesion molecule)	Mol. Adh.	GnRH-I, Olf	SN	SK
Anosmine	Mol. Adh.	GnRH-I, Olf	SN	
EphA5/EphA, EphB (Ephrines)	F.G répulsif	GnRH-I, Olf	SN	
Nelf (Nasal embryonic LHRH Factor)	F.G. attractif	GnRH-I, Olf	SN	
Netrin-1/Netrin1R	F.G. attractif	GnRH-I, Olf	SN	SK
Reelin	F.G. attractif	GnRH-I	SN	
Semaphorin4D/Plexin/HGF	F.G. attractif	GnRH-I	SN	
Semaphorin3A/Neuropilin2/PlexinA1	F.G. attractif	GnRH-I, Olf	SN	
SDF1/CXCR4 (chemokines)	F.C répulsif	GnRH-I, Olf	LCE, cerveau	SK, HHin
FGF8/FGFR1	F.C. attractif	GnRH-I, Olf	SN	
HGF/cMet	F.C. attractif	GnRH-I, Olf	LCE, cerveau	
Axl/Tyro3	F.C. attractif	GnRH-I	LCE, cerveau	
GABA	N.T. répresseur	GnRH-I, Olf	SN, LCE, cerveau	
CCK8/CCK-1R (cholecistokinie)	N.T. répresseur	GnRH-I, Olf	SN	

Tableau 1 : Liste de facteurs impliqués dans la migration des neurones à GnRH-I au cours du développement embryonnaire. Quatre types de molécules sont distingués (classification) : les molécules d'adhésions (Mol. Adh.), les Facteurs de guidances (F.G) qui peuvent être attractif ou répulsif, les facteurs de croissance (F.C.) et les neurotransmetteurs (N.T). Ces facteurs peuvent être impliqués (système ciblé) dans la mise en place du système GnRH-I et/ou du système olfactif et peuvent intervenir dans la migration des neurones à GnRH-I dans différentes régions : le septum nasal (SN), la lame criblée de l'ethmoïde (LCE) et dans le cerveau. Une mutation de certains des gènes codant pour ces molécules a été mise en évidence dans le syndrome de Kallman (SK) ou des syndromes d'hypogonisme-hypogonotrophique idiopathique normosmique (HHin). Selon les données de Wray et al 2002, Wray et al 2010, Wierman et al 2010. (*) selon Hanchate et al 2012

- des molécules de guidages et les facteurs de croissances chimio-attractives ou chimio-répulsives tels que les Sémaforines, les nétrines, ou encore le FGF8 et son récepteur FGFR1, vont guider la migration des neurones à GnRH-I directement ou indirectement en agissant sur la croissance des terminaisons des nerfs. Ces molécules peuvent être attractives ou répulsives selon le tissu et régulent la migration des neurones à GnRH-I par gradient de concentration Wray 2002; Wray 2010).
- des neurotransmetteurs tels que le GABA_A et la cholecystochinine (CCK) qui, au niveau de la lame criblée de l'ethmoïde, inhibent la migration des neurones à GnRH-I et contribuent ainsi à l'entrée des neurones dans le cerveau à une période propice à leur différenciation (Fueshko et al. 1998; Giacobini et al. 2004).

Ainsi de nombreux facteurs sont impliqués dans la migration et le développement des neurones à GnRH-I, dont le plus part régulent également le système GnRH-I à l'âge adulte (Wierman et al. 2010). Bien que les neurones à GnRH-I expriment un certain nombre de ces molécules /récepteurs, cela ne signifie pas qu'ils soient actifs dans toutes les régions, comme nous l'avons précisé dans le tableau. De plus, les neurones à GnRH-I présentent un phénotype hétérogène (Todman et al. 2005) qui pourrait être important pour moduler la migration à différents temps de la gestation selon l'environnement tissulaire des neurones. L'hétérogénéité d'expression de l'ensemble de ces facteurs par les neurones à GnRH-I empêcherait qu'une seule mutation génétique induisent un défaut de (Wierman et al. 2010). Cependant il existe des syndromes d'hypogonadisme-hypogonadotrophique (HH) anosmique (ou syndrome de Kallmann, SK) et l'HH idiopathique normosmique (HHin), qui entraînent un défaut de migration de ces neurones et par conséquent une stérilité à l'âge adulte (Pitteloud et al. 2006). Ces syndromes sont généralement dus à une mutation mono-génique impliquant des gènes dont le produit peut être une molécule membranaire ou un facteur diffusible (**Tableau 1**) Pitteloud et al. 2006). Ces dernières années il a également été mis en évidence des phénotypes hétérogènes et synergiques dus à des mutations di-géniques de gènes dont les produits sont impliqués dans la migration de ces neurones, comme par exemple FGFR1 et NELF (Pitteloud et al. 2007).

II. 2. d. L'environnement glial des neurones à GnRH-I au cours du développement embryonnaire

Comme nous venons de le voir de nombreuses études s'intéressent aux facteurs impliqués dans la régulation de la migration des neurones à GnRH-I mais très peu d'entre-elles s'intéressent au microenvironnement cellulaire qui serait susceptible de les produire. Dans ce chapitre nous avons pourtant vu que les neurones à GnRH-I n'étaient pas les seules cellules à migrer de la fosse nasale au cerveau, de nombreux types neuronaux mais également des cellules gliales migrent jusqu'à la vésicule télencéphalique.

1. Caractéristiques des cellules gliales olfactives engainant les axones olfactifs

Ces cellules gliales nommées cellules olfactives engainantes (olfactory ensheathing cells, OEC) dérivent de la crête neurale (Barraud et al. 2010; Forni et al. 2011b; Katoh et al. 2011). Leurs progéniteurs font partie de la masse migratoire qui quitte la fosse nasale vers E10,5 chez la souris et qui parcourt le septum nasal jusqu'à la base du télencéphale (Blanchart et al. 2011; De Carlos et al. 1995; Doucette 1990; Miller et al. 2010). Elles ont été décrites pour la première fois par Golgi (Shepherd et al. 2011) comme une classe de cellule gliale unique restreinte au système olfactif principal. Dans la littérature plusieurs noms les désignent : la glie des nerfs olfactifs (olfactory nerves glial), les cellules de Schwann du nerf olfactif (olfactory nerve Schwann cells) ou encore cellules de Schwann olfactives (olfactory Schwann cells)(Chuah and Au 1991; Doucette 1984; Ramon-Cueto et al. 1993).

En effet ces cellules ont comme caractéristique d'envelopper les axones olfactifs dès la sortie de l'épithélium olfactif au bulbe olfactif principal, au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte (Doucette 1990; Graziadei and Monti Graziadei 1985; Marin-Padilla and Amieva 1989). De plus ces cellules possèdent des caractéristiques morphologiques, antigéniques (**Tableau 2**) et fonctionnelles communes aux cellules de Schwann mais également aux astrocytes (Ramon-Cueto and Avila 1998). En effet elles peuvent être bipolaires et supporter la croissance axonale comme les cellules de Schwann, ou comme les astrocytes elles peuvent être un soutien cellulaire multipolaires.

Antigène	cellules de Schwann	OEC	astrocyte
GFAP (Glial fibrillary acidic protein)	+	+	+
S100β	+	+	+
NCAM (Neuronal cell adhesion molecule)	+	+	+
Vimentine	+	+	astrocyte immature
O4 (oligodendrocyte marker 4)	+	+	-
P75^{NTR} (low affinity nerve growth factor receptor)	+	+	-
Mpzero (Myelin protein zero)	+	+	-
Cx43 (Connexin 43)	-	+	+
BLBP (Brain lipid binding protein)	-	+	-
Nestin	-	+	-
NPY (Neuropeptide Y)	-	+	-

Tableau 2 : Listes des antigènes exprimés par les cellules olfactives gliales engainantes (OEC), par les cellules Schwann et les astrocytes.

Ces variabilités morphologiques et antigéniques, qui sont extrêmement bien décrites dans la littérature *in vivo* et *in vitro*, dépendent du stade étudié et du lieu d'intérêt (la lamina propria à la sortie de l'épithélium olfactif, le long des axones olfactifs dans le septum nasal, au niveau de la couche des nerfs olfactifs (ONL) et au niveau de la couche externe du bulbe olfactif) (Barnett 2004; Chuah and Au 1991; Doucette 1993; Franceschini and Barnett 1996).

Fonctionnellement plusieurs rôles leurs sont attribués. Elles contribuent à la croissance des nerfs olfactifs au cours du développement et au renouvellement physiologique des neurones sensoriels olfactifs (Richter et al. 2008) grâce à leur capacité de migration. En effet ces cellules sont sensibles aux facteurs attractifs sécrétés par le bulbe olfactif (Liu et al 1995) au cours du développement embryonnaire tel que le GDNF (Cao et al 2006) mais également à des facteurs sécrétés par d'autres régions du cerveau telque le néocortex (Graziadei et al 1979). Elles guident la croissance axonale en activant la voie des sémaphorines tel que la sémaphorine 3A (Schwartz et al 2000) mais également la voie des éphrines (St John et al 2002). Elles maintiennent une croissance axonale continue en enveloppant les axones, et fournissent un substrat cellulaire contenant des facteurs favorables à l'élongation (Doucette 1990), Ramon-Cueto and Valverde 1995, Kafitz and Greer 1999). Ainsi les OEC expriment des molécules d'adhésion telles que les NCAM à tous les stades de développement (Miragall 1989, 1988), et Wnt4 qui induit l'extension des axones des neurones olfactifs (Rodriguez-Gil and Greer 2008). Les OEC possèdent également des fonctions immunitaires innées et protègent ainsi les tissus olfactif des pathogènes en sécrétant des facteurs immunitaires tels que les chemokines (Vincent et al 2005). Ces dernières années il a été mis en évidence un rôle de ces cellules gliales dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuronaux mais également dans la survie de ces progéniteurs (Zhang et al 2008). Enfin les OEC régulent la formation du bulbe olfactif (pour revue Su et al 2010) en permettant le contact entre les axones olfactifs et le bulbe olfactif présomptif (Doucette 1989) et en encapsulant les glomérules (Marine-Pedilla et al 1989).

2. Les cellules gliales engainant les axones voméronasaux

En ce qui concerne les axones du système olfactif accessoire, quelques études mettent en évidence la présence de cellules gliales, que les auteurs nomment cellules de Schwann, autour des nerfs voméronasaux chez le rat au cours du développement embryonnaire (Fraher et al 1982) post-natal (Ichikawa and Osada 1995) et chez l'adulte (Raisman 1985). L'arrangement de ces cellules gliales le long de ces axones s'apparente à celui qui est décrit pour les axones olfactifs ; c'est à dire une couche engainante continue le long des axones, avec une glie limitante au niveau de bulbe olfactif accessoire (pour revue Fraher et al 2002). Cependant, très peu d'études s'y intéressent et les décrivent. Quelques-unes mentionnent la présence de ces cellules gliales à proximité des neurones à GnRH-I en migration et suppose que ces cellules seraient des OEC. Des observations faites par microscopie électronique montrent des cellules de morphologie gliale associées à des neurones à GnRH-I en migration dans le septum nasal d'embryon de souris âgés de E13,5 (Livne et al 1993). Une autre étude qui s'intéresse aux propriétés neurotrophiques de la S100, met en évidence la présence de cellules immunoréactive à la protéine S100 et à la GFAP le long du trajet de migration des neurones à GnRH-I (Cummings and Brunjes 1995). Au cours de cette thèse une étude a montré à E12 chez la souris, la présence de progéniteurs gliaux BLBP positif et des cellules GnRH-I immunoréactives dans la masse migratoire marquée à la double-cortine (Miller et al 2010). De même au cours de ces trois dernières années, il a été montré *in vitro*, dans des cultures d'explants de placodes olfactives, la présence de cellules gliales de types OEC étroitement associées aux neurones à GnRH-I à 7div et 21div (Forni et al 2011b, Franschescini et al 2010).

II.3. La différenciation embryonnaire des neurones à GnRH-I

II. 3. a. Une différenciation précoce des neurones à GnRH-I

Les neurones à GnRH-I commencent à se différencier très tôt au cours du développement embryonnaire puisqu'ils expriment la *GnRH-1* à partir de E11,5 chez la souris (Wray et al 1989a), 1-2 jours après le début des dernières divisions des précurseurs (Wray et al 1989a, Jasoni 2009) et produisent suffisamment de GnRH-I pour être immunodétectés dès E12,5 (Schwanzel-Fukuda et al 1989, Wray et al 1989b).

II. 3. b. Une différenciation qui s'étend tout au long de la migration des neurones à GnRH-I

1. Une différenciation morphologique

Les études menées *in vivo* et *in vitro* montrent une différenciation morphologique des cellules à GnRH-I tout au long du développement embryonnaire. Aux premiers stades de développement entre E11,5 et E13,5 *in vivo* (Schwanzel-Fukuda et al 1989, Wray et al 1989b) et jusqu'à 3 jours de cultures *in vitro* (Fueshko et wray 1994) les neurones à GnRH-I présentent une morphologie ronde avec des neurites courts dans la fosse nasale. Au cours de leur migration entre E12,5 et E15,5 *in vivo* (Schwanzel-Fukuda et al 1989, Wray et al 1989b) et jusqu'à 5-6 jours de cultures *in vitro* (Fueshko et wray 1994) les cellules grandissent et deviennent bipolaires. A E16,5, ces neurones, dont les corps cellulaires sont distribués dans l'aire pré-optique, présentent une extension importante de leurs prolongements dans l'éminence médiane (Schwanzel-Fukuda et al 1989, Wray et al 1989b). En fin de gestation la taille des axones s'accroît ainsi que leur contenu en granules de sécrétions (Schwanzel-Fukuda et al 1989, Wray et al 1989b).

2. Une différenciation fonctionnelle

L'ensemble des études menées ces vingt dernières années montrent une bio-disponibilité du GnRH-I au cours de la migration de ces neurones, une machinerie fonctionnelle pour la sécrétion de GnRH-I et enfin une sensibilité des cellules gonadotropes de l'hypophyse à la GnRH-I.

En effet une augmentation graduelle de la quantité moyenne du transcrit de la GnRH-I a été décrite dans le nez et dans le cerveau de souris entre E12,5 et E19,5 (Simonian et Herbisson 2001), suggérant que cette transcription dépend de signaux régulateurs présents tout le long de la route migratoire de ces neurones. Il a également été mis en évidence chez le rat que le pourcentage de neurones à GnRH-I possédant le décapeptide mature s'accroît entre E12,5 et E14,5, puisque seulement 15% de cette population présentent de la GnRH-I amidée à E12,5 contre 85% à E14,5 (Livne et al. 1993). Des études de microscopie électronique ont mis en évidence que cette GnRH-I présente dans le cytoplasme à E12,5 et détectée dans l'appareil de Golgi et les granules de sécrétion à partir de E14,5 chez le rat (Zheng et al. 1992), Silverman et al 1993). *In vitro* à partir de cultures d'explant de placodes olfactives de souris, Constantin et al. (2009) ont mis en évidence une sécrétion pulsatile de GnRH-I qui débute autour de 3div

et qui augmente entre 7 et 14div (**Figure 8**). L'ensemble de ces résultats suggère que la GnRH-I peut être sécrétée au cours du développement embryonnaire.

Enfin plusieurs études mettent en évidence la sensibilité de l'adéno-hypophyse à une stimulation de GnRH-I au cours du développement embryonnaire *in vivo*. Chez le mouton, il a été mis en évidence le rôle central de la GnRH-I dans la régulation de l'ontogenèse et de la fonction hypophyso-gonadique pendant la vie fœtale, en stimulant la production de LH et de FSH à partir de E70 (le terme de la gestation chez le mouton étant de 145 jours) (pour revue Brooks et al 1995). Chez le rat, la GnRH-I peut stimuler la libération de LH en fin de gestation, puisqu'une injection de GnRH-I entraîne une augmentation du contenu de LH plasmatique à E18,5 (Daikoku et al 1981).

II. 3. c. Une période clef dans la différenciation des neurones à GnRH-I : le passage de la lame criblée de l'ethmoïde

Une régulation spécifique des neurones à GnRH-I se ferait au niveau de la jonction entre le nez et le cerveau à E14,5, puisque plusieurs études mettent en évidence une nette augmentation du transcrit au niveau de la lame criblée de l'ethmoïde à ce stade (Simonian et Herbisson 200, Wray 2002) et qu'une entrée prématurée des neurones à GnRH-I dans le cerveau a comme conséquence une diminution d'expression de GnRH-I dans le cerveau (Wray et al 2002).

III. Le système GnRH, une cible des perturbateurs endocriniens à activité œstrogéno-mimétique

III.1. Rôle des œstrogènes dans le développement et la régulation du système GnRH-I

Comme nous l'avons vu dans les deux premiers paragraphes de cette introduction bibliographique, la régulation et le développement du système GnRH-I sont extrêmement complexes et dépendent de nombreux acteurs dont les hormones stéroïdiennes. Le rôle des œstrogènes sur la physiologie des neurones à GnRH-I est bien connu. En effet à forte concentration, l'œstradiol est responsable du pic pré-ovulatoire de GnRH-I en induisant un rétrocontrôle positif sur la fréquence des pulses de GnRH-I chez le primate, le mouton et le rongeur (Xia et al. 1992) Caraty et al 1998,(Herbison 1998), tandis qu'une faible concentration d'œstradiol induit un rétrocontrôle négatif sur la fréquence des pulses de GnRH-I (Ordog et al 1997). Ainsi de nombreuses études décrivent l'effet de l'œstradiol sur la physiologie cellulaire des neurones à GnRH-I chez la souris et le primate tel que l'activité calcique (Romano et al 2008, Abe et al 2008, Temple et al 2004), l'activité électrique (Chu (Chu et al. 2009) et la sécrétion de GnRH-I (Abe et Terasawa 2005).

Les neurones à GnRH-I sont sensibles à l'œstradiol précocement au cours du développement, puisqu'une exposition à ce stéroïde sexuel en période néonatale chez la souris, entraîne une augmentation du nombre de neurones à GnRH-I chez le mâle (Grober et al 1998). Le rôle des œstrogènes dans le bon développement des neurones à GnRH-I a également été mis en évidence *in vitro* sur des cultures d'explants de placodes olfactives de mouton (Agca et al. 2008). En effet il a été observé qu'un antagoniste de récepteur à l'œstradiol induit une diminution importante de la neurogenèse des précurseurs des neurones à GnRH-I.

On peut donc supposer qu'une exposition extra-physiologique d'œstrogènes pourrait avoir des conséquences sur la régulation mais également sur la mise en place du système GnRH-I. En effet, chez les mammifères les hormones sexuelles sont capables de franchir la barrière placentaire et d'agir directement sur le fœtus (Slob AK 1980). Cependant en condition physiologique, le fœtus est protégé de l'action des œstrogènes maternels grâce à l' α -foetoprotéine. De plus, bien que le développement embryonnaire des neurones à GnRH-I ne présente pas de dimorphisme sexuel, le mode d'action des hormones sexuelles à cette période de la vie est différent entre les femelles et les mâles (Gorski 1985). En effet au cours de

développement embryonnaire, les femelles ne sont pas exposées aux œstrogènes, puisque les ovaires ne produisent pas d'hormones sexuelles avant la puberté. Ce qui n'est pas le cas des mâles dont les testicules fœtaux produisent les œstrogènes issus de l'aromatisation de la testostérone, qui est indispensable à la masculinisation du cerveau en période périnatale et à l'activation du comportement sexuel à l'âge adulte (pour revue McCarthy et al 2009).

Ainsi, une aberration du profil d'exposition à des molécules à activité œstrogénique ou anti-œstrogéniques au cours du développement pourrait causer un défaut du développement du système GnRH-I mais aussi du système nerveux central et périphérique exprimant des récepteurs aux œstrogènes (RE) fonctionnels. Cette aberration peut survenir suite à une exposition à des perturbateurs endocriniens (PE), qui peuvent franchir la barrière placentaire et être en contact direct avec le fœtus.

III.2. Le système GnRH une cible des perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique ou anti-œstrogénique

Les perturbateurs endocriniens sont définis par l'organisation mondiale de la santé comme « une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou (sous-)populations » (world health organization, WHO 2002).

Le groupe de molécule identifié comme des perturbateurs endocriniens est très hétérogène et inclut des composés industriels, des solvants/lubrifiants (Polychlorinated biphenyls, PCB, Dioxine), de l'industrie plastique (le bisphénol A, BPA), les dérivés des produits industriels (les dioxines TCDD), les fongicides (vinclozoline) et les pesticides (methoxyclore) (pour revue Diamanti-Kanrakis et al 2009). Les produits pharmaceutiques et les phytoestrogènes sont également considérés comme des perturbateurs endocriniens lorsqu'ils sont consommés en grande quantités ou lorsque les médicaments sont donnés à des niveaux élevés, à des périodes inappropriées du développement (par exemple pendant la gestation) ou quand ils sont présents dans l'environnement en quantité biologiquement active (pour revue Gore et al 2010). Ces perturbateurs endocriniens environnementaux comprennent les hormones naturelles dérivant des stéroïdes sexuels, tels que le 17 α -oestradiol et l'oestrone et des hormones de synthèses originaire de l'industriel pharmaceutique, telles que le 17 α -éthinyloestradiol, le Diéthylstilbestrol, le Tamoxifène (Gore and Patisaul 2010).

Les PE ont en commun l'induction de modifications de l'homéostasie endocrinienne par des mécanismes d'actions multiples et complexes en interagissant avec des récepteurs aux œstrogènes (ER), androgènes (AR) et sont susceptibles d'avoir des conséquences délétères pour les organismes. Les PE peuvent interagir avec les récepteurs hormonaux en mimant l'action des hormones naturelles (effet agoniste), ou en bloquant de manière compétitive ou non compétitive l'action des hormones naturelles sur leurs récepteurs (effet antagoniste) (Frye et al. 2012).

Plusieurs études ont ainsi établi un lien entre la présence de PE dans l'environnement et l'apparition de troubles du développement ou de la fonction de reproduction (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). Chez l'Homme, il y a de fortes suspicions quant à l'implication des PE dans l'incidence croissante de certaines pathologies telles que les cancers hormonaux-dépendants, l'oligospermie, l'endométriose, et la cryptorchidie (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). De même, les PE sont incriminés dans les troubles de la fertilité et dans l'apparition de pubertés précoces (Diamanti-Kandarakis et al. 2009).

Ces phénomènes peuvent être mis en lien avec le contrôle de la fonction de la reproduction par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope et notamment par un effet de perturbateurs endocriniens sur les neurones à GnRH. De ce fait ces dernières années plusieurs études s'intéressent aux effets des perturbateurs endocriniens sur le système GnRH.

Des travaux menés *in vitro* mettent en évidence sur la lignée de neurones à GnRH-I de souris GT1-7, qu'un traitement aux pesticides organochlorés œstrogène-mimétiques (tels que le méthoxychlore et le clorpyrifos), aux solvants PCB (Aroclor 1121 et Aroclor 1254), ou encore aux phyto-œstrogènes, induisent une augmentation de l'expression du GnRH-I (Dickerson et al. 2011; Gore et al. 2002)(Bowe et al 2003). A partir d'explants hypothalamiques de rats, Rasier et ses collaborateurs ont mis évidence en un effet du DDT et du BPA sur l'augmentation de la fréquence des pulses de GnRH-I (Rasier et 2008, Rasier et al 2007)

In vivo il a été mis en évidence chez les mammifères une augmentation de la fréquence de sécrétion pulsatile de GnRH-I chez le rat, après une exposition néonatale de DDT (Rasier et al 2007) et de BPA (Fernandez et al 2009). Tandis qu'un traitement au coumestrol, un phytoestrogène, chez le rat adulte entraîne une diminution de la fréquence de sécrétion pulsatile de GnRH-I (McGarvey et al 2001). Des expositions fœtales chez le mouton à des mixtures de composés présents dans les boues d'épuration (Bellingham et al 2010) ou à une combinaison de BPA et de méthoxychlore (Mahonney and Padmanabhan 2010) induisent une

diminution de l'expression de GnRH-I dans l'hypothalamus mais aussi une diminution de l'expression du récepteur à la GnRH (Bellingham et al 2010). Chez le rat l'exposition à la TCDD au cours du développement embryonnaire induit une augmentation du contenu de GnRH-I dans l'hypothalamus et une diminution de libération de GnRH-I mesurés sur des explants hypothalamiques (Clements et al 2009).

III.3. Le 17 α -éthinyloestradiol et le système GnRH

III. 3. a. Effets du 17 α -éthinyloestradiol sur le système GnRH

Dans le cadre de ce travail de thèse nous avons choisi d'étudier les effets d'un xéno-oestrogène : le 17 α -éthinyloestradiol (EE₂) sur le système GnRH-I.

Le 17 α -éthinyloestradiol (**Figure 10**) est une hormone stéroïde de synthèse utilisée principalement dans les contraceptifs hormonaux mais également dans l'hormonothérapie substitutive. L'EE₂ est métabolisé dans le foie par éthynylation et hydroxylation, puis il est inactivé par conjugaison (pour revue Stanczyk et al 2013). Le groupement éthynyl ralentit la métabolisation de l'estradiol et modifie considérablement ses propriétés pharmaceutiques ; puisque la demi-vie de l'EE₂ est de 30h dans le plasma humain tandis que celle de l'E₂ est d'approximativement 1h (Bolt et al 1979). Contrairement à l'E₂, l'extraction de l'EE₂ se fait majoritairement dans les fèces (62%) et non dans les urines (38%) ; et 40% de l'EE₂ retrouvé dans les urines ne serait pas métabolisé (Johnson et William 2004). Ce composé est évacué dans les effluents des stations d'épuration et libéré dans le milieu aquatique. Dans la majorité des effluents les niveaux d'EE₂ sont inférieurs aux limites de détections des procédures (0,03ng/L), cependant il a toutefois été détecté dans certains effluents à des niveaux supérieurs à 5ng/ml et dans des eaux de surfaces à des concentrations comprises entre 0,4 ng/l et 15 ng/l (Linterman et al 2003, Cargouet et al. 2004; Desbrow et al. 1998; Ternes et al. 1999) et pouvant atteindre exceptionnellement des concentrations supérieures à 40 ng/l (Ternes et al. 1999) (**Figure 11**). De plus des tests de biodégradation ont montré que le temps de demi-vie de l'EE₂ dans les eaux de rivière était environs 14 fois supérieur à celui de l'E₂ (17 jours versus 1,2 jour) (Jürgens et al 2002). Plusieurs travaux suggèrent également que l'EE₂ est capable de se bio-accumuler dans les organismes à des concentrations allant de 1,4-1,6ng/ml chez le poisson (Al-Ansari et al. 2010).

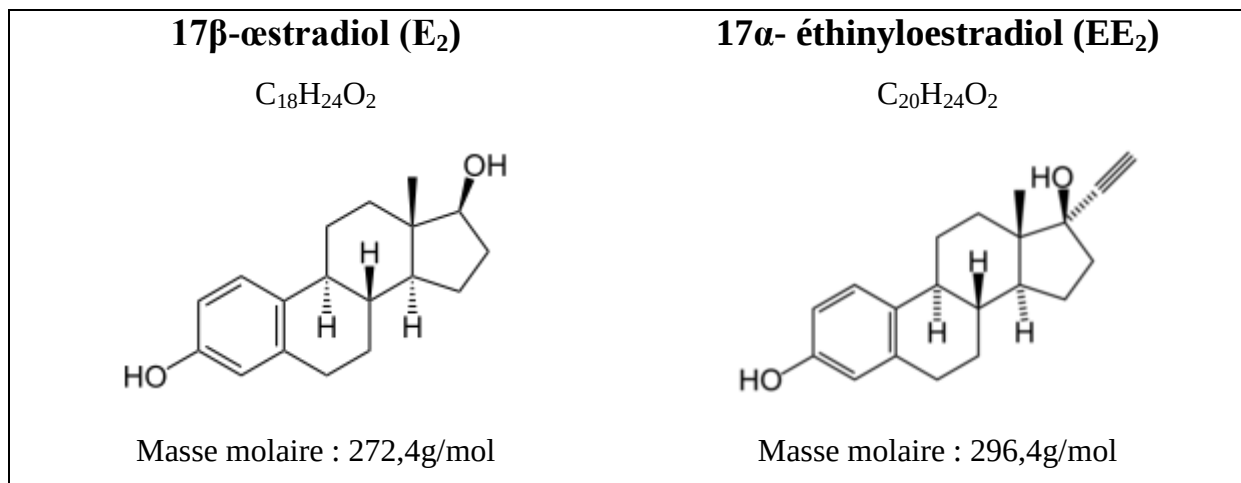


Figure 10 : Représentation de la molécule du 17β-œstradiol et du 17α-éthinyloestradiol

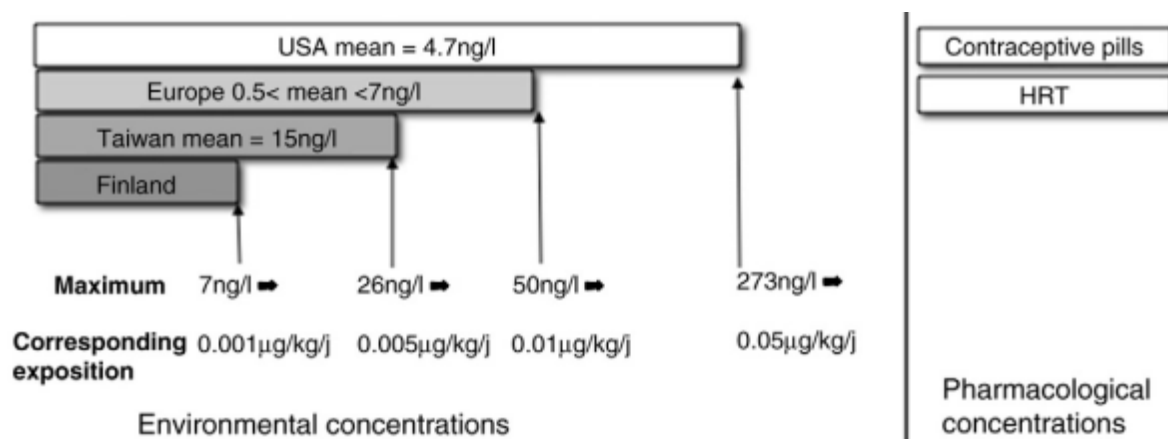


Figure 11 : Gammes de concentrations de 17α-éthinyloestradiol retrouvées dans les eaux de différents pays et dans les traitements hormonaux. Adapté de Pillon et al 2012

Plusieurs travaux ont montré que l'EE₂ avait des effets délétères sur la fonction de reproduction chez le rongeur. Un traitement *in utéro* et au cours de la lactation d'EE₂ induit une stérilité et une dérégulation du cycle oestrien à des fortes concentrations (400ng/kg/jour) (Fusani et al 2007, Della-Seta 2008). A des faibles doses (4ng/kg/jour) elle induit des altérations de la fécondité et du comportement sexuel (Fusani et al 2007, Corrieri et al 2007). Ces dernières années, des études ont également mis en évidence l'effet de l'EE₂ sur le développement des neurones à GnRH-I chez la souris (Pillon et al. 2012; Vosges et al. 2012). Ainsi une exposition moyenne et longue (1 à 3 semaines) à des doses environnementale d'EE₂ d'œufs de poissons zèbres fertilisés induit une augmentation du nombre de neurones à GnRH-III immunoréactif, de manière proportionnelle à la dose d'exposition (Vosges et al. 2010) Vosges et al. 2012). Un traitement de 10 jours à une concentration de 0,1nM entraîne une diminution de la taille des fibres GnRH-III (Vosges et al 2010). Chez la souris, une exposition *in utéro* comprise entre E10 et E13 induit également une augmentation du nombre de neurones GnRH-I proportionnellement à la dose du traitement (Pillon et al 2012).

III. 3. b. Mode d'action de l'EE₂ via les récepteurs à l'œstradiol

L'EE₂ a une activité œstrogéniques en se fixant avec une affinité élevée sur les récepteurs nucléaires aux œstrogènes ERα et ERβ (Cosnefroy et al. 2009; Legler et al. 2002, Shyu 2011). De plus récemment il a été mis en évidence que l'effet de l'EE₂ sur l'ontogénèse des neurones à GnRH-III, chez le poisson zèbre, est médié par ces récepteurs, puisqu'il est abolit en présence d'un inhibiteur des récepteurs ERα et ERβ (l'ICI182-780) (Vosges 2012).

Ces récepteurs aux œstrogènes peuvent activer la transcription des gènes cibles après fixation du ligand (pour revue Watson et al 2007). Cette réponse dite lente (heures à minutes) comprend deux mécanismes de régulation transcriptionnelle (**Figure 12**) :

- i) L'**activité transcriptionnelle ERE dépendante**, qui est le mécanisme de régulation le plus classique. La liaison du ligand à son récepteur, après diffusion à travers la membrane plasmique, mène à la dimérisation du récepteur de façon stable et à sa translocation nucléaire (Shiau et al. 1998). Dans le noyau, il se fixe sur des séquences ERE (Estrogen Responsive Element) situées en amont des gènes cibles via le domaine de liaison à l'ADN. Cette fixation entraîne le recrutement des co-activateurs essentiels à l'activité transcriptionnelle.

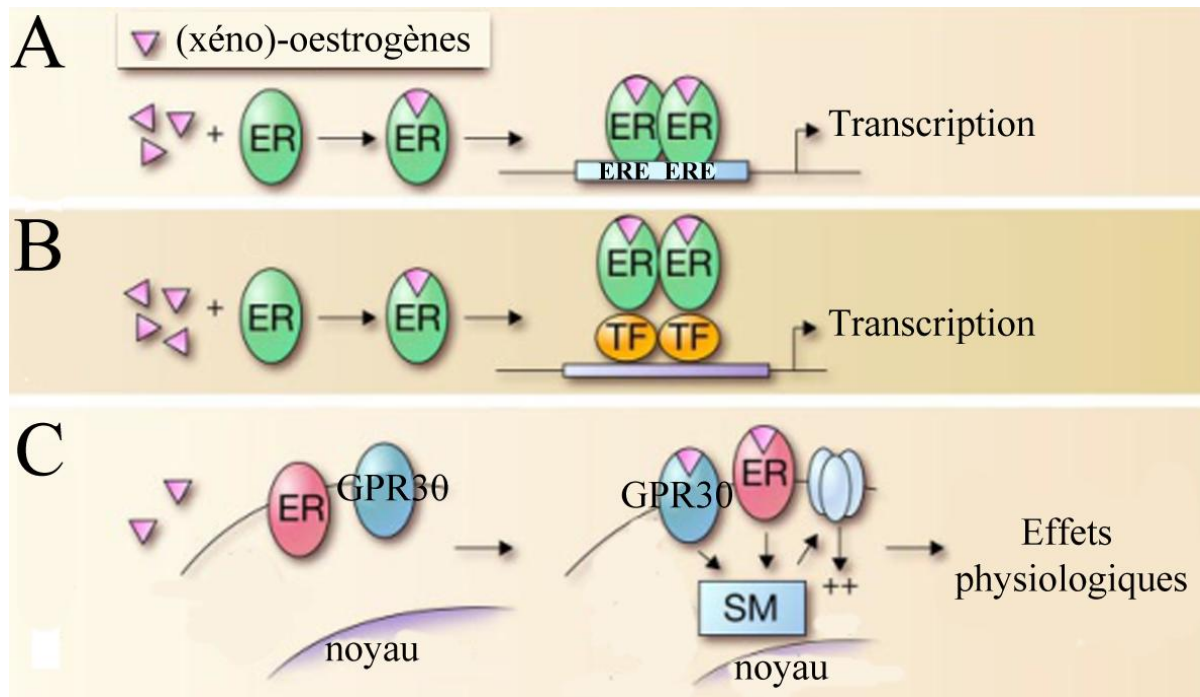


Figure 12 : Schéma représentant les voies moléculaires utilisé par les récepteurs à l'œstradiol (ER et GPR30) après fixation de leur ligand. (A) Voie activation génomique directe : les récepteurs ER α ou ER β (RE) liés à leur ligand se dimérisent et se fixent directement sur l'élément de réponse aux oestrogènes (ERE) en amont du gène cible ce qui permet d'activer la transcription. (B) Voie d'activation génomique indirecte, le dimère de récepteur ER interagit avec des facteurs transcriptions (TF), permettant une liaison indirecte à l'ADN. (C) Voie d'activation non génomique, le ligand se fixe aux récepteurs membranaires ER α ou ER β (RE) ou GPR30, par l'intermédiaire de second messenger (SM) ils activent des cascades de signalisations qui peuvent influencer sur les canaux ioniques et induire un effet physiologique rapide. Adapté de Heldring et al 2007

ii) L'activité transcriptionnelle ERE-indépendante. Les récepteurs des œstrogènes, après interaction avec leur ligand, sont capables de moduler l'expression de gènes qui ne possèdent pas de séquence ERE dans leur région promotrice. Après la translocation nucléaire des ER, ils interagissent directement avec des facteurs de transcription actifs, qui sont fixés à la région promotrice des gènes cibles, et activent ainsi la transcription.

Ces récepteurs ER α et ER β peuvent également activer une voie non génomique (pour revue Herbison, et al 2009, Watson et al 2007) (**Figure 12**), induisant un effet rapide des œstrogènes (quelques secondes à quelques minutes) sur la régulation des neurones à GnRH-I chez l'adulte (Chu et al. 2009) (Romano et al 2008) et chez l'embryon (Temple et al 2004). En effet, les récepteurs ER α et ER β peuvent être transportés vers la membrane plasmique, après modification post-traductionnelle (Ascenzi et al. 2006, Galluzzo et al. 2007). Ces actions rapides de l'E2 sont capables d'induire l'activation de plusieurs voies de signalisations dont la voie des cAMP/PKA dans les neurones à GnRH-I de souris (Abraham et al 2003), la voie des phospholipase C et de la PKC α , induisant un influx de calcium dans diverses populations cellulaires (Picotto et al. 1996; Perret et al. 2001) . Un troisième récepteur membranaire des oestrogènes, de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, appelé GPR30 serait également impliqué dans certains effets non génomiques des œstrogènes sur l'activité des neurones à GnRH-I chez le primate (Noel et al. 2009)(Terasawa et al 2009)

L'étude de Vosges et ses collaborateurs (2011) ne permet pas d'affirmer que le mode d'action de l'EE₂ sur les neurones à GnRH-I via ER α et/ou ER β soit direct. En effet bien que l'expression et la production de ER α ont été mis en évidence dans les neurones à GnRH-I chez de nombreuses espèces (Herbison et al 1998), l'expression et la production d'ER β n'ont pas été détectées dans les neurones à GnRH-I chez l'embryon (Sharifi et al 2002), chez le rongeur pré-tubaire et adulte (Herbison and Papes 2001, Kallo et al 2001). De plus les études menés à partir de souris ER α KO et ER β KO ont permis de mettre en évidence que les régulations physiologiques de l'oestradiol sur l'activité des neurones à GnRH-I lors des rétro-contrôles négatifs et positifs impliquent principalement le récepteur ER α , puisque seul une déficience de ER α conduit à une dérégulation importante du phénotype endocrinien (Beauvillain 2008; Clarke 2011), ce qui suggère que l'effet des œstrogènes et des xénoestrogènes sur les neurones à GnRH-I serait transmis indirectement par des afférences neuronales, ou encore des cellules gliales (pour revue Herbison 2009).

OBJECTIFS

La période de développement péri-embryonnaire est critique pour la mise en place de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope. Un défaut de migration des neurones à GnRH-I entraîne une hypofertilité voire une stérilité à l'âge adulte (Miraoui et al. 2011). Ces neurones se différencient au cours de leur migration (Levine and Ramirez 1982), et présentent une activité sécrétrice précoce au cours du développement (Foster 1972)

En ce qui concerne la majorité des différentes populations neuronales, très peu d'études s'intéressent au microenvironnement cellulaire impliqué dans l'ontogenèse des neurones à GnRH-I. En effet il est maintenant bien établi que la migration des précurseurs neuronaux du système nerveux central vers leur destination finale, et la projection des axones vers leurs cibles impliquent des interactions cellules-matrice extracellulaire et cellule-cellule (Keiko 1995). Il a été montré que dans le cortex cérébral (originaire de l'ectoderme du tube neural), les neuroblastes sont guidés par la glie radiaire au cours de leur migration (Rakic 1990, Hatten 1993). Les progéniteurs de la crête neurale utilisent des prolongements cellulaires et la matrice extracellulaire pour atteindre leur destination (Bronner-Fraser 1992). Les neurones à GnRH-I ont une double origine : le territoire ectodermique de la placode olfactive et la crête neurale (Forni et al. 2011). Cette double origine tissulaire des neurones à GnRH-I n'exclut pas le fait qu'ils puissent posséder un environnement glial au cours de leur migration. En effet, quelques études suggèrent et décrivent la présence de cellules gliales le long de la route migratoire de ces neurones (Fraher 1982).

Dans ce contexte nous posons comme hypothèse que **les neurones à GnRH-I possèdent un environnement glial au stade précoce du développement et que celui-ci serait nécessaire à la migration mais également à la mise en place de la sécrétion pulsatile de GnRH-I et participerait à la régulation de l'activité des neurones à GnRH-I**

Le premier objectif de cette thèse a été de caractériser l'environnement glial des neurones à GnRH-I en migration *in vitro*. Dans un premier temps, nous avons étudié le développement de cet environnement glial associé aux neurones à GnRH-I sur des cultures de placodes olfactives, puis caractérisé le phénotype de ces cellules gliales (**article 1: Olfactory ensheathing cells form the microenvironment of migrating GnRH-I neurons during mouse development. *Glia***). Dans une seconde étude, nous avons caractérisé *in vivo* l'évolution

spatiotemporelle du phénotype de ces cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I en migration (**article 2** : Rostral maturation of glial ensheathing cells associated to GnRH-I neurons during mouse development, en préparation pour Eur J Neurosci).

Le second objectif de cette thèse a été d'étudier, *in vitro*, les effets d'un perturbateur endocrinien, le 17- α -éthinyloestradiol (EE₂), sur l'expression de gènes codants des cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I. En effet, le développement et la régulation du réseau neuroendocrine GnRH-I est dépendant des hormones stéroïdiennes (Clarke 2011; Herbison 1998; Parhar et al. 2012) et constitue donc une cible privilégiée pour des perturbateurs endocriniens (PE) à activité oestrogénique ou anti-oestrogénique. Récemment, des études ont mis en évidence l'effet d'un PE à activité oestrogéno-mimétique, le 17- α -éthinyloestradiol (EE₂), sur l'ontogenèse des neurones à GnRH-I (Pillon et al. 2012; Vosges et al. 2012). Afin de déterminer quelles sont les cibles moléculaires potentiellement impliquées dans les effets de l'EE₂ sur le développement et la régulation des neurones à GnRH-I, nous avons étudié l'effet d'une concentration compatible avec une exposition environnementale de ce PE sur le transcriptome des cellules gliales GFAP-GFP isolées à partir de cultures d'explants de placodes olfactives.

RESULTATS

Chapitre 1

Les neurones à GnRH-I en migration sont associés aux cellules gliales olfactives

I. Contexte scientifique

Les neurones à GnRH-I migrent le long des axones des nerfs voméronasaux et du nerf terminal (Wray 2011). Bien que de nombreuses études s'intéressent aux facteurs diffusibles et aux molécules d'adhésions impliquées dans la migration des neurones à GnRH-I (Wray 2011), peu d'études s'intéressent au micro-environnement cellulaire qui pourrait produire ces facteurs. Quelques études mentionnent la présence de cellules gliales à proximité des neurones à GnRH-I en migration : i) trois études menées *in vivo*, sur des embryons de souris à E13,5 (Livne et al. 1993; Miller et al. 2010) et sur des nouveau-nés d'opossums (Cummings and Brunjes 1995), ii) deux études menées *in vitro*, sur des cultures d'explants de placodes olfactives de souris (Forni et al 2011, Franceschini 2012). Néanmoins, la présence de cellules gliales le long des axones olfactifs a été décrite (Doucette 1989; Farbman 1990), ainsi que le long des axones voméronasaux (Fraher 1982) et le long du nerf terminal (Zheng et Jourdan 1993a). Ce sont les cellules gliales engainant les axones olfactifs, nommées cellules olfactives engainantes (ou Olfactory ensheathing cell = OEC) qui sont principalement décrites dans la littérature (Farbman 1990) (Lindsay et al.) ((Vincent et al. 2003) ((Franceschini and Barnett 1996). **Ainsi le but des deux études présentées dans ce chapitre est de déterminer si les neurones à GnRH-I possèdent un environnement glial au cours du développement embryonnaire.** Pour mener à bien ces études nous avons utilisé une lignée de souris transgéniques hGFAP-GFP (human Glial fibrillary acidic protein - Green Fluorescence Protein) (Zhuo et al 1997). Dans ce modèle de souris la GFP est codée par un transgène sous la dépendance du promoteur du gène de la *GFAP* humaine (Zhuo et al 1997), une protéine de filaments intermédiaires du cytosquelette, exprimée par les cellules gliales du système nerveux central et du système nerveux périphérique (Astic et al 1998, Pellitteri et al 2010). L'utilisation d'un système rapporteur permet de détecter les cellules gliales exprimant la GFAP précocement au cours du développement (Baba et al. 1997; Morita et al. 1997). Une lignée de souris transgéniques GnRH-eGFP a également été utilisée (Spergel et al 1999). Dans ce modèle de souris la GFP est codé par un transgène sous la dépendance du promoteur du gène du *GnRH-I* (Spergel et al 1999).

II. Article 1 :

Les cellules gliales olfactives engainantes forment le microenvironnement des neurones à GnRH-I en migration

- Schéma général des études menées

Pour mener à bien cette étude une approche *in vitro* a été menée sur des cultures d'explants de placodes olfactives provenant de souris GFAP-GFP âgées de 11,5 jours de développement embryonnaire et une approche *in vivo* sur des embryons GFAP-GFP âgés de 12,5 jours de développement embryonnaire (E), E13,5, E14,5 et E15,5.

- Environnement glial et cinétique de mise en place

A partir de cultures de placodes olfactives nous avons mis en évidence la présence d'un environnement glial [GFP+] associé aux neurones à GnRH-I sur tissus frais (grâce à la fluorescence émise par la GFP et à la réfringence des neurones à GnRH) et par immunohistochimie. L'association étroite des deux types cellulaires a été confirmée par microscopie électronique. Les observations des tissus frais et immunomarqués (GFP-ir) montrent que les cellules gliales [GFP+] et/ou GFP-ir sont détectées hors de l'explant avant la détection des premiers neurones à GnRH-I suggérant qu'elles débutent leur migration avant les neurones à GnRH-I ou qu'elles proviennent d'un territoire moins éloigné. L'analyse du ratio de la distance des fronts de migration des deux types cellulaires au cours du développement *in vitro* nous a permis de montrer que les cellules gliales GFP-ir arrêtent leur migration après que les neurones GnRH-ir se soient arrêtés.

Des résultats préliminaires menés *in vivo* montrent que le long des axones voméronasaux, les neurones à GnRH-I sont également associés à des cellules gliales GFP-ir dès 12,5 jours de développement embryonnaire. Une cartographie des cellules [GFP+] et des neurones à GnRH-I a été réalisée à partir de marquages immunohistochimiques de coupes sagittales de têtes d'embryons de souris âgées de E12,5 à E15,5. Une corrélation de la répartition spatio-temporelle a été mise en évidence dès la sortie du VNO jusqu'au niveau de la jonction naso-cérébrale.

- Caractérisation phénotypique des cellules gliales

Cette étude a montré par RT-PCR, que les cellules gliales [GFP+] triées par FACS (Fluorescence activating cell sorting) à partir des cultures d'explants, expriment des gènes codant pour des molécules connues pour intervenir dans la migration des neurones à GnRH-I

(*Nelf* et la *Sémaphorine 4D*). Par exemple, des mutations affectant le gène codant *Nelf* sont retrouvées dans des cas d'hypogonadisme hypogonadotrope (syndrome de Kallmann) (Miura et al 2004). La caractérisation par RT-PCR et par immunocytochimie des cellules [GFP+] a mis en évidence que ces cellules gliales correspondent à différentes sous-populations de cellules olfactives engageantes.

- Conclusion et modèle proposé

Ces résultats montrent que des cellules gliales précèdent et accompagnent les neurones à GnRH-I au cours de leur migration. Ces cellules gliales peuvent être caractérisées comme des cellules olfactives engageantes (OEC) en raison de la combinaison de marqueurs qu'elles expriment. Néanmoins elles présentent une grande hétérogénéité phénotypique. Elles expriment aussi des molécules connues pour être impliquées dans la migration des neurones à GnRH-I. Ainsi, nous proposons dans ce premier article un modèle dans lequel les OEC joueraient un double rôle : i) tout d'abord en tant que cellules "meneuses", qui dirigeraient la migration des neurones à GnRH-I en créant un gradient chimiotactique ; ii) et d'autre part en tant que support cellulaire en créant une matrice spécifique et un microenvironnement qui faciliterait la migration de ces neurones.

III. Article 2 :

Maturation des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I en migration dans le septum nasal

- Schéma général des études menées

Dans cette étude, nous avons caractérisé l'évolution spatio-temporelle du phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I en migration *in vivo* sur des souris GnRH-GFP âgées de 11,5 jours de développement embryonnaire (E11,5) ainsi que des souris GFAP-hGFP et des souris sauvages âgées de E12,5 E13,5 et E15,5. Pour mener à bien cette étude, nous avons développé un nouvel anticorps anti-GnRH-I performant sur du tissu embryonnaire.

- Les progéniteurs gliaux engainent les neurones à GnRH-I de la sortie de l'organe voméronasal à l'entrée du diencéphale

A partir de coupes sagittales de têtes d'embryons de souris âgés de 11.5 jours de développement embryonnaire, nous avons mis en évidence la présence de progéniteurs gliaux, BLBP-immunoréactif (ir) associés aux neurones à GnRH-I le long des axones voméronasaux dans le septum nasal (NS). A partir de E12,5, nous avons détecté une association des deux types cellulaires jusqu'à la partie proximale du nerf terminal au niveau de la jonction entre la vésicule télencéphalique et le diencéphale.

- Evolution du phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I en migration

Dès E13,5, nous détectons des cellules gliales matures GFAP-GFP-ir qui engainent les neurones à GnRH-1. La majorité des cellules GFAP-GFP-ir est observée dans le NS, et une faible proportion est mise en évidence au niveau de la jonction naso-cérébrale et du bulbe olfactif (NFJ-OB). A E13.5, à l'aide de doubles marquages dirigés contre la BLBP et GFAP-GFP, nous détectons que plus de 70% des cellules gliales engainant les neurones à GnRH-I sont simplement immunoréactives à la BLBP, dans le NS et au niveau de la NFJ-OB.

A E15,5 les cellules doublement marquées GFAP-GFP-ir et BLBP-ir sont la population gliale majoritairement associée aux neurones à GnRH-I dans le NS. A ce stade, la proportion de cellules doublement marquées au niveau de la NFJ-OB reste minoritaire.

L'évolution spatio-temporelle du phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I peut être interprétée comme une maturation précoce des cellules gliales du NS. La caractérisation du phénotype de ces cellules gliales sur un champ plus large nous permet d'affirmer que la maturation rostrale des cellules gliales olfactives n'est pas spécifique aux cellules associées aux neurones à GnRH-I mais concerne l'environnement glial colonisant ces différentes structures.

- La quantification du microenvironnement cellulaire des neurones à GnRH-I en migration

La quantification de ce microenvironnement révèle que plus de 60% des cellules associées à ces neurones sont des cellules gliales (BLBP-ir et/ou GFAP-GFP-ir), quelque soit le stade de développement et la localisation. De plus nous mettons en évidence que plus de 90% des neurones à GnRH-I sont associés à au moins une cellule gliale (BLBP-ir et/ou GFAP-GFP-ir) aux trois stades étudiés et ce, dans les deux régions d'intérêt. Cet environnement glial constitue donc le microenvironnement majoritaire des neurones à GnRH-I en migration.

- Conclusion

Une maturation rostrale des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I en migration est mise en évidence au niveau du septum nasal. Les cellules gliales olfactives colonisant la jonction entre le septum nasal et le diencephale présentent un phénotype immature. Ces résultats suggèrent donc que les cellules gliales immatures accompagnent les neurones à GnRH-I jusqu'à l'entrée du diencephale tandis que les cellules gliales mûrent arrêtent de migrer pour coloniser le septum nasal.

Maturation des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I en migration dans le septum nasal

Sarah Geller, Didier Lomet, Alain Caraty, Yves Tillet, Anne Duittoz and Pascal Vaudin
Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 0085 INRA, 6175 CNRS,
Université François Rabelais de Tours, IFCE, IFR135 Imagerie Fonctionnelle. 37380
Nouzilly. France

Résumé

Au cours du développement embryonnaire, les neurones à GnRH-I proviennent de la placode olfactive et migrent de l'organe voméronasal au cerveau le long des nerfs voméronasaux et du nerf terminal. Dans une précédente étude, nous avons mis en évidence que les neurones à GnRH-I en migration présentent un microenvironnement glial chez la souris. Dans cette étude, nous caractériserons l'évolution spatio-temporelle du phénotype glial des neurones à GnRH-I en migration chez la souris *in vivo* de 11,5 jours de développement embryonnaire (E11,5) jusqu'à E15,5. Pour mener à bien cette étude, nous avons développé un nouvel anticorps anti-GnRH-I performant sur le tissu embryonnaire. Notre étude met en évidence la présence de progéniteurs gliaux, BLBP-immunoréactifs (ir), associés aux neurones à GnRH-I dès 11,5 jours de développement embryonnaire le long des axones voméronasaux dans le septum nasal (NS), puis dès E12,5 le long du nerf terminal au niveau de la jonction entre la vésicule télencéphalique et le diencephale. Les cellules gliales matures GFAP-GFP-ir qui engainent les neurones à GnRH-I sont détectées dès E13,5 dans le NS, et en faible proportion au niveau de la jonction naso-cérébrale et du bulbe olfactif (NFJ-OB). A ce stade les doubles marquages BLBP et GFAP-GFP mettent en évidence que la majorité des cellules gliales engainant les neurones à GnRH-I est simplement immunoréactive à la BLBP dans les deux régions d'intérêt. A E15,5 on observe que les cellules doublement marquées GFAP-GFP et BLBP-ir sont les cellules gliales majoritairement associées dans le NS. La proportion de cellules doublement marquées au niveau de la NFJ-OB reste minoritaire. L'évolution spatio-temporelle du phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I peut être interprétée par une maturation plus précoce des cellules gliales du NS qu'au niveau de la NFJ-OB. La quantification de ce microenvironnement révèle que plus de 60% des cellules associées à ces neurones sont des cellules gliales, quelque soit le stade de développement et la localisation. Cet environnement glial constitue donc le microenvironnement majoritaire des neurones à GnRH-I en migration.

Introduction

Pour l'ensemble des mammifères, la fonction de reproduction est sous le contrôle d'un décapeptide, la GnRH-I (Gonadotropin-Releasing Hormone). Les neurones qui produisent la GnRH-I sont d'origine extra-cérébrale, puisqu'ils sont issus des placodes olfactives et migrent pendant la vie embryonnaire le long des nerfs voméronasaux et du nerf terminal dès 11,5 jours de développement embryonnaire chez la souris (Schwanzel-Fukuda et al. 1989; Wierman et al. 2010; Wray 2010). Ainsi, à l'âge adulte, leurs corps cellulaires se situent dans deux régions distinctes de l'hypothalamus : la région septo-préoptique (qui regroupe le septum médian et l'aire préoptique POA) et l'hypothalamus médio-basal (Jasoni et al. 2009; Spergel et al. 1999).

Dans une précédente étude, nous avons mis en évidence, sur des cultures de placodes olfactives, la présence de plusieurs sous-populations de cellules olfactives engainantes (OEC) environnant les neurones à GnRH-I (Geller *et al.*, 2012). En effet, une grande variabilité du phénotype de ces cellules gliales a été observée *in vitro* (Geller *et al.*, 2012). Cependant un des marqueurs, la BLBP (Brain Lipid Binding Protein) est exprimée par 90,4% des OEC dont 62,3% co-exprimaient la GFAP après 10 jours de culture (Geller *et al.*, 2012). La BLBP ou FABP7 (Fatty Acid-Binding Protein), est un membre spécifique d'une large famille de protéines de liaison de ligands hydrophobes (Feng et al. 1994). Elle est connue en tant que marqueur des cellules gliales radiaires dans le système nerveux central (NSC) (Anthony and Heintz 2007; Anthony et al. 2004; Feng et al. 1994). Les progéniteurs des OEC (pOEC) exprimant la BLBP sont détectés dans la région de la placode olfactive entre E10-E11 (Anthony et al. 2004; Murdoch and Roskams 2007). Le traçage du lignage dans le système olfactif à l'aide de souris transgéniques BLBP-Cre/Rosa26, a révélé que l'expression de la BLBP est spécifique aux cellules gliales qui engainent les axones, dès la naissance des nerfs dans la *lamina propria* présomptive (Murdoch and Roskams 2007). Ce profil d'expression a été confirmé chez les souris transgéniques BLBP-GFP (Miller et al. 2010) et par la détection de l'immunoréactivité à la BLBP (Carson et al. 2006; Murdoch and Roskams 2008). *In vitro*, il a également été mis en évidence, à partir de jeunes colonies semi-adhérentes d'EO, que les cellules mitotiques de type glioblastique exprimant la BLBP donnent exclusivement des cellules gliales immunoréactive à la protéine S100 β (Murdoch & Roskams, 2008). Ainsi la BLBP est un marqueur précoce des OEC. La GFAP quant à elle, est connue en tant que marqueur plus tardif des OEC au cours du développement embryonnaire et post-natal (Astic

et al. 1998; Pellitteri et al. 2010; Valverde et al. 1992) et est décrit comme un marqueur tardif des OEC (Astic et al. 1998).

Dans notre précédente étude *in vivo*, les neurones à GnRH-I en migration présentaient un environnement glial GFAP-GFP à partir de E12,5 de la sortie du VNO jusqu' à la jonction naso-cérébrale (NFJ), mais l'évolution du phénotype de ces cellules gliales n'avait pas été finement caractérisé puisque seul le marqueur tardif GFAP (via la détection de la GFP) avait permis d'établir la cinétique de développement (Geller et al 2012). Afin de pouvoir étudier l'implication de ces cellules gliales dans l'ontogenèse des neurones à GnRH-I il était important de pouvoir les caractériser au cours du temps, et en particulier de suivre l'évolution spatiale et temporelle des formes précoces et matures des OEC.

L'objectif de cette étude est de caractériser l'évolution du phénotype de l'environnement glial des neurones à GnRH-I *in vivo*, au cours du développement, à l'aide d'un marqueur précoce des OEC, la BLBP et d'un marqueur plus tardif des OEC, la GFAP en utilisant des souris transgéniques GFAP-GFP.

Ce travail a permis de montrer la présence d'un environnement BLBP-ir associé aux neurones à GnRH-GFP en migration dès E11,5, le long des axones voméronasaux, eux même caractérisés par leur immunoréactivité à la périphérine. A l'aide d'animaux transgéniques GFAP-GFP et d'immunomarquages dirigés contre la BLBP, nous caractérisons l'évolution spatio-temporelle du phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I. Dans cette étude nous considérons que des cellules sont associées si la distance qui sépare les noyaux des deux types cellulaires est inférieure ou égale à la taille d'un noyau. Nous comparons le phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I à celui des cellules gliales environnantes sur une surface de $155\mu\text{m}^2$ (qui correspond à un champ d'observation au microscope confocal, avec un objectif x40). Pour mener à bien cette étude, il a été nécessaire de réaliser des triples marquages et donc de développer un nouvel anticorps anti-GnRH-I performant sur le tissu embryonnaire.

Matériel et méthode

Animaux

Les lignées de souris transgéniques hémizygotes FVB/N-Tg (GFAP-GFP) ont été fournies par le Laboratoire Jackson (USA). Les animaux ont été hébergés dans l'unité expérimentale de physiologie animale (INRA, Tours, France) selon les conditions décrites dans l'étude précédente (Geller et al 2012). Les souris hémizygotes FVB/N-Tg (GFAP-GFP) ont été détectées par PCR.

Antisérum contre la GnRH-I

L'anticorps GnRH-I #517 a été obtenu après immunisation de bœufs avec le peptide EHWSYGLRPG-NH₂ (GnRH-I) (Aneosystem, Groupe NSPE, France) couplé à la BSA, selon le protocole précédemment décrit par Caraty et al 1980.

Dosage radio-immunologique

La réactivité croisée de plusieurs séquences de peptides GnRH-I (GnRH-I, GnRH-II, GnRH-Hyp9 et GnRH-2-10) avec du GnRH-I marquée à l'Iode 125 (GnRH-I¹²⁵, Sigma L7134) sur les anticorps GnRH-I #517 (dilué au 1 :150 000 dans du PBS glycérolé), a été testée par radio-immunologie selon le protocole précédemment décrit par Caraty et al 1980. La séquence des acides aminés du peptide GnRH-II de poulet (Peninsula, 7210) possède une similarité de 70% avec celle du GnRH-I (Figure 1). Elle diffère principalement en Cterm, avec la présence d'un Tryptophan en position 7 et d'une Tyrosine en position 8 au lieu d'une Leucine et d'une proline. (Figure 1). La séquence de GnRH-Hyp9 (Neosystem, SP89180C) consiste en l'hydroxylation de la Proline en position 9. Le peptide GnRH-2-10 (NeoMPS) possède la séquence du GnRH-I avec une délétion de l'acide glutamique (E) en position 1.

Préparation du tissu pour les études d'immunohistochimie

Pour la caractérisation de l'anticorps anti-GnRH-I #517, les souris adultes ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale de sodium pentobarbital (CEVA Santé Animale, France; 8mg/40g de poids corporel) avant d'être perfusées en intracardiaque avec 32ml de nitrite de sodium 1% puis 160ml de paraformaldéhyde (PFA) à 4% préparé dans 0,1M de solution tampon phosphate (PBS, pH 7,4). Les cerveaux prélevés sont conservés dans une solution de sucrose à 30% à 4°C puis enrobés de Tissue-Tek (Sakura-Fnetek, Europe BV, Zoeterwoude,

The Netherlands) avant d'être congelés dans de la neige carbonique. Trois séries de coupes frontales consécutives de l'hypothalamus (coupes flottantes de 30µm) ont été réalisées à l'aide d'un cryostat Leica CM 3050S (Leica Biosystems, Nanterre, France) puis conservées dans du PBS Azide 0,1% à 4°C.

Après euthanasie des femelles gestantes par dislocation cervicale, les embryons hémizygotes FVB/N-Tg (GFAP-GFP) et sauvages FVB/N (âgés de E11,5, E12,5, E13,5 et E15,5) ont été prélevés. Les têtes des embryons ont été fixées, puis conservées dans du PBS-sucrose 30% avant d'être congelées selon le protocole décrit dans l'étude Geller et al 2012. Des coupes sagittales consécutives de 20µm ont été montées sur des lames SuperforstPlus (thermo Fisher scientific Inc, Waltham, MA, USA) puis conservées à -20°C.

Immunohistochimie

Les produits dont l'origine n'est pas précisée ont été fournis par Sigma Aldrich (Lyon, France).

Coupes de cerveaux adultes

Les coupes flottantes de cerveaux de souris adultes homozygotes GnRH-GFP C75Bl6 (n=3) et sauvages FVB/N (n=3) ont été incubées 20 minutes à température ambiante dans un milieu de blocage PBS-BSA2 (PBS avec 2% de sérum albumine bovin (BSA) et 0,3% de Triton). Après blocage, la première série de coupes de chaque cerveau a été incubée avec l'anticorps anti-GnRH-I #517 (fait chez le mouton) dilué au 1 : 10 000 dans du PBS-BSA2 pendant une nuit à 4°C sous agitation. Après 3 rinçages de 10 minutes dans du PBS, les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de mouton CY3 (Jackson ImmunoResearch, IgG H+L) dilué au 1 : 500 dans du PBS-BSA2 pendant 2h30 à température ambiante sous agitation.

Coupes de têtes d'embryons

L'ensemble des coupes de têtes d'embryons ont été incubées 20 minutes à température ambiante dans un milieu de blocage PBS-BSA10 (PBS avec 10% de BSA et 0,3% de Triton).

Simple marquage de l'anticorps GnRH-I #517

Pour la caractérisation de l'anticorps GnRH-I #517 fait (chez le mouton), les coupes de têtes d'embryons de souris sauvages FVB/N âgés de E15,5 (n=2) et des coupes des souris homozygotes GnRH-I-GFP C75Bl6 de E15,5 (n=1) ont été incubées avec l'anticorps GnRH-I #517 fait chez le mouton dilué au 1 : 1 000 dans du PBS-BSA10 pendant une nuit à 4°C. Les coupes des têtes d'embryons de souris GnRH-I-GFP ont également été incubées avec de

l'anticorps anti-GFP fait chez le poulet (1:1000, Abcam ab13970). Après 3 rinçages de 10 minutes au PBS, les coupes ont été incubées avec de l'anti-IgG de mouton et de l'anti-IgY de poulet (pour les coupes GnRH-I-GFP) dilué dans du PBS-BSA2 pendant 2h30 à température ambiante.

Triples marquages

Les coupes d'embryons hémizygotes FVB/N-Tg (GFAP-GFP) âgés de E12,5 à E15,5 (n=11) ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires anti-BLBP fait chez le lapin (1:1000, Millipore AB9558), anti-GFP fait chez le poulet (1:1000, Abcam ab13970) et anti-GnRH-I #517 fait chez le mouton dilués dans du PBS-BSA10. Après 3 rinçages de 10 minutes au PBS, les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires anti-IgG-lapin Alexa Fluor 647 (au 1 : 1000, Molecular Probes #A31573) et anti-IgG-mouton Fab Cy3 (au 1 : 500, Jackson ImmunoResearch #713-166-174) dilués dans du PBS-BSA10 pendant 2h30 à température ambiante. Les coupes ont ensuite été rincées au PBS, 3 fois pendant 10 minutes, puis la révélation de la GFP a été réalisée par incubation d'anticorps anti-IgY-poulet biotinylé (1:500, Vector, BA-9010), incubées pendant 2h à température ambiante, puis après 3 rinçages au PBS, les coupes ont été incubées avec une Streptavidine DyLight-488 (1:1000, Jackson Immunoresearch, #016-480-084) pendant 1h à température ambiante.

Des triples marquages utilisant deux antisérums primaires de lapin ont également été réalisés (Negoescu et al. 1994). Les coupes d'embryons sauvages FVB/N (âgés de E12,5 à E15,5, n=9) et les coupes d'embryons homozygotes GnRH-I-GFP (âgés de E11,5, n=4) ont été incubées respectivement avec le sérum GnRH-I #517 ou avec de l'anti-GFP. Ces coupes ont également été incubées avec l'anticorps anti-BLBP dilué dans du PBS-BSA10 pendant une nuit à 4°C. Après 3 rinçages de 10 minutes au PBS, les coupes ont été incubées avec les anticorps secondaires anti-IgG-mouton Fab Cy3 ou anti-IgY-poulet FITC (1 : 1000, Jackson ImmunoResearch 703-095-155) et anti-IgG-lapin Alexa 647, dilués dans du PBS-BSA10 pendant 2h30 à température ambiante. Les coupes ont ensuite été rincées 5 fois dans du PBS pendant 10 minutes, puis un second blocage a été réalisé avec du sérum de lapin normal dilué au 1:500 dans du PBS-BSA10, pendant 30 min. Après 5 rinçages dans du PBS pendant 10 minutes, une saturation des gammaglobulines de lapin a été réalisée avec des fragments Fab d'anticorps anti-IgG-lapin non marqués (dilués au 1:500 dans du PBS avec 0,3% de Triton, Jackson ImmunoResearch 111-007-003) pendant 1h. Après 5 rinçages au PBS pendant 10 minutes, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-périphérine fait chez le lapin (1:1500 Millipore AB1530) dilué dans du PBS-BSA10 pendant une nuit à 4°C. Les

coupes ont été rincées 3 fois au PBS pendant 10 minutes, puis incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG-lapin Alexa 555 (1 : 1000, Molecular Probes A31572) ou Alexa 488 (1 : 500, Molecular Probes A21206).

Pour l'ensemble des coupes, les noyaux ont été marqués avec une solution de Hoechst 33258 à 2 µg/ml (Molecular Probes, Invitrogen) pendant 2 minutes. Les coupes ont été montées entre lame et lamelle avec du Fluoromount (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA).

Contrôle de spécificité du marquage

Pour contrôler la spécificité de l'anticorps anti-GnRH-I #517, des tests de pré-absorption avec du peptide GnRH-I (Sigma, L7134) ont été réalisés. Le GnRH-I a été incubé toute la nuit à 4°C à différentes concentrations (25µM et 250µM) avec l'anticorps primaire GnRH-I #517 (dilué au 1:10 000 pour les tissus adultes ou au 1:1000 pour les tissus embryonnaires). Puis, l'immunohistochimie a été réalisée comme décrit précédemment, sur la première série de coupes de cerveaux de souris adultes sauvages FVB/N et sur des coupes de têtes d'embryons de souris sauvages FVB/N.

Acquisition et observation

Les observations ont été faites à l'aide d'un confocal Zeiss LSM 700 et le logiciel associé ZEN. Des piles d'images de 1024 par 1024 pixels ont été acquises séquentiellement (la résolution du z était de 0,5µm et de 1µm) avec l'objectif à immersion x40. Des mosaïques ont également été réalisées (image de 512 par 512 pixels) avec l'objectif x20.

Pour les comptages, les observations ont été faites à l'objectif x40 et le noyau de chaque cellule immunoréactive à la GnRH-I a été centré sur les trois plans de l'espace x, y, z. Les cellules immunoréactives à la BLBP et à la GFP dans chaque champ observé (de 155 µm²) sont considérées comme étant l'environnement glial des neurones à GnRH-I. Nous considérons une cellule associée aux neurones GnRH-I toute cellule dont la distance qui sépare le noyau de cette cellule et le noyau du neurone à GnRH-I est inférieure ou égale à deux fois le rayon d'un noyau de cellule gliale, soit selon les mesures réalisées dans cette étude le diamètre de la cellule est $\leq 6,05\mu\text{m}$. Les mesures et les comptages ont été réalisés à l'aide du logiciel ZEN.

Statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés sur le logiciel statistique Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Pour chaque analyse, nous avons calculé la moyenne et l'écart standard à la moyenne (ESM). Afin de tester la présence de différences significatives entre les moyennes des proportions des trois phénotypes gliaux (BLBP-ir, GFP-ir et BLBP-GFP-ir) en fonction du stade de développement (E12,5 E13,5 et E15,5) et de la région (NS ou NFJ), une analyse de variance à deux facteurs avec mesures répétées (Two-way ANOVA) a été réalisée. Celle-ci nous permet également de déterminer une possible interaction entre les deux paramètres (le stade embryonnaire et la région), pour chaque type glial. Lorsque cette dernière était significative, une comparaison des échantillons deux à deux à l'aide d'un « posthoc » t-tests avec une correction de Bonferroni a été réalisée.

Résultats

Afin de caractériser l'évolution phénotypique de microenvironnement glial des neurones à GnRH-I en migration, nous avons utilisé un marqueur de progéniteurs des cellules gliales engainantes, la BLBP, et un marqueur de cellules gliales matures, la GFAP, sur des coupes d'embryons âgés de E11,5 à E15,5. Pour mener à bien cette étude un sérum anti-GnRH-I fait chez le mouton (GnRH-I#517) a été développé et caractérisé

Caractérisation de la spécificité de l'anticorps GnRH#517

Analyse par dosage radio-immunologique

L'analyse par dosage radio-immunologique montre une diminution de la liaison du GnRH-I¹²⁵ à l'anticorps GnRH-I #517 corrélée l'augmentation de la concentration de peptide GnRH-I (**Figure 1**). Nous avons analysé la possibilité d'une réaction croisée du GnRH-I¹²⁵ avec des peptides de séquences similaires : le GnRH-2-10, le GnRH-Hyp9 et le GnRH-II, sur l'anticorps GnRH-I#517. Nous observons une inhibition minime (<1%) avec le GnRH-II de poulet (**Figure 1**), qui ne présente pas les mêmes acides-aminés que le GnRH-I en position 7 et 8 en Cterm. Une légère réaction croisée (<10%) est observée avec le peptide GnRH-Hyp9 (**Figure 1**) qui présente une hydroxylation de la Proline en Cterm. L'augmentation de la concentration du GnRH-2-10, qui est modifié en position Nterm, induit une diminution de la liaison de l'anticorps au GnRH- I¹²⁵ (**Figure 1**). Ainsi la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps nécessite que l'extrémité C-term de l'antigène ne soit pas modifié. Ces résultats

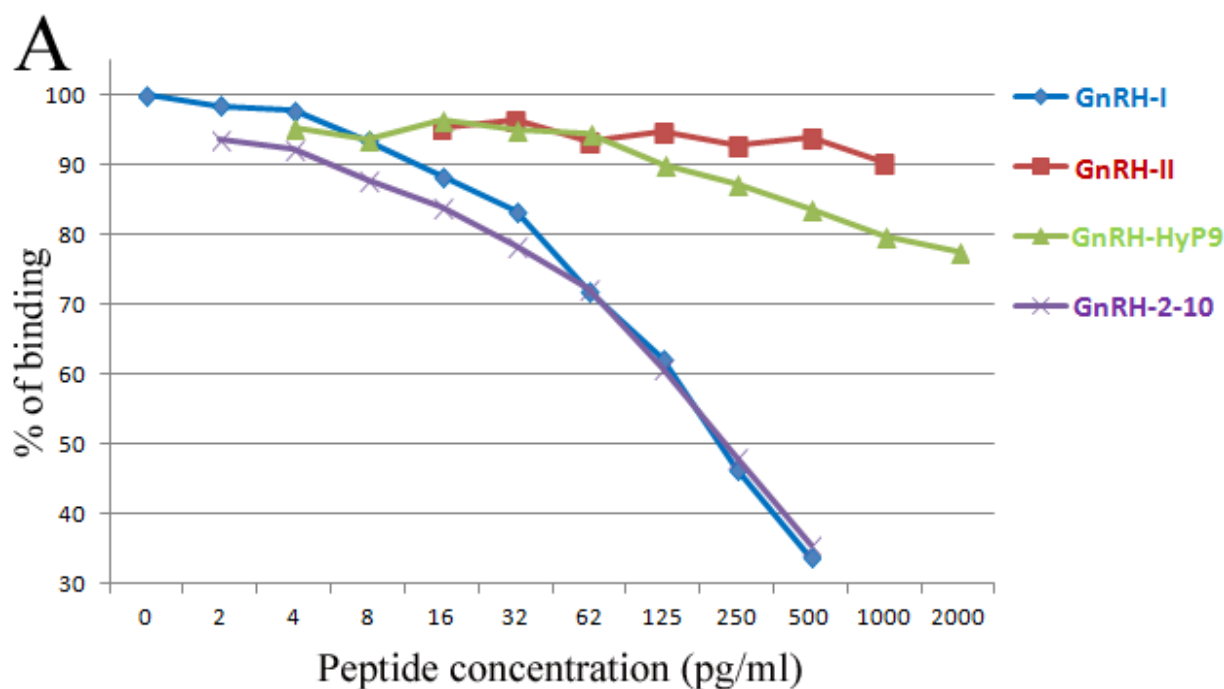


Figure 1 : Courbe d'inhibition de la liaison du peptide GnRH-I et de dérivés synthétiques à l'anticorps GnRH-I #517, obtenue par dosage radio-immunologique. (A) Une diminution de la liaison du GnRH-I¹²⁵ à l'anticorps GnRH-I #517 est observée avec l'augmentation de la concentration (en pg/ml) du peptide GnRH-I. On observe une importante réaction croisée de l'anticorps avec le GnRH-2-10, légère avec le GnRH-HyP9 et minime avec le GnRH-II. (B) Comparaison des séquences des acides aminés du GnRH-I « mammalien » et du GnRH-II « de poulet ».

montrent donc non seulement la spécificité de l'anticorps GnRH-I #517 vis-à-vis du GnRH-I mais également l'importance des acides aminés C-terminaux pour la liaison à l'anticorps.

Caractérisation de l'anticorps GnRH-I#517 sur tissus adulte et embryonnaire

La spécificité du marquage a été confirmée par l'absence de celui-ci lors d'un défaut d'anticorps primaire lors de la première incubation. Les analyses immunohistochimiques révèlent un marquage ponctiforme des corps cellulaires et des fibres immunoréactives au GnRH-I#517, sur les tissus adulte et embryonnaire (**Figure 2** et **Figure 3**). L'immunomarquage de coupes frontales d'hypothalamus de souris adulte GnRH-I-GFP nous a permis de mettre en évidence que la majorité des corps cellulaires GnRH-GFP sont immunoréactifs au GnRH-I #517 au niveau du septum médian et des bandes diagonales de Broca (donnée non illustrée), de l'aire pré-optique médiane et du noyau prés-optique antéro-ventral (**Figures 2A** et **2F**) et médian (MPOM) (donnée non illustrée). On observe, sur les coupes rostrales de l'hypothalamus, un grand nombre de fibres immunoréactives au GnRH-I #517 qui contiennent faiblement de la GFP (**Figures 2A''**). Afin de confirmer la spécificité du marquage observé, des tests de pré-absorption du sérum GnRH-I #517 avec des concentrations croissantes d'antigènes GnRH-I, ont été réalisés sur des coupes frontales d'hypothalamus de souris sauvages (**Figures 2B', 2C', 2D', 2E'**). Lorsque le sérum GnRH-I #517 a été pré-absorbé avec 25µM de GnRH-I, on observe une abolition du marquage des corps cellulaires dans l'aire pré-optique (POA, **Figure 2B, B'**), et une diminution importante du marquage des fibres le long du 3ème ventricule dans le noyau arqué postérieur (ArcP) et dans l'éminence médiane EM (**Figures 2C, C'**). Une pré-absorption du sérum GnRH-I #517 avec 250µM de GnRH-I entraîne une abolition du marquage, aussi bien des corps cellulaires (**Figures 2D, D'**) que des fibres (**Figures 2E, E'**).

Notre étude s'intéresse aux neurones à GnRH-I en migration au cours du développement embryonnaire, de ce fait nous avons également caractérisé cet anticorps par immunohistochimie sur des coupes sagittales de têtes d'embryons de souris âgées de 15,5 jours (E15,5). Les marquages d'embryons de souris GnRH-GFP, montrent que les corps cellulaires et les fibres GnRH-GFP sont immunoréactives au GnRH-I #517 dans le septum nasal (NS) (non illustré), au niveau de la jonction naso-cérébrale (NFJ) mais également dans le diencéphale (Die) (**Figure 3A, A'**). Dans le VNO, une faible proportion de cellules GnRH-GFP est immunoréactive au GnRH-I#517 (non illustré). Des marquages avec l'anticorps GnRH-I#517 ont également été réalisés sur des coupes d'embryons sauvages (**Figure 3B-B'**).

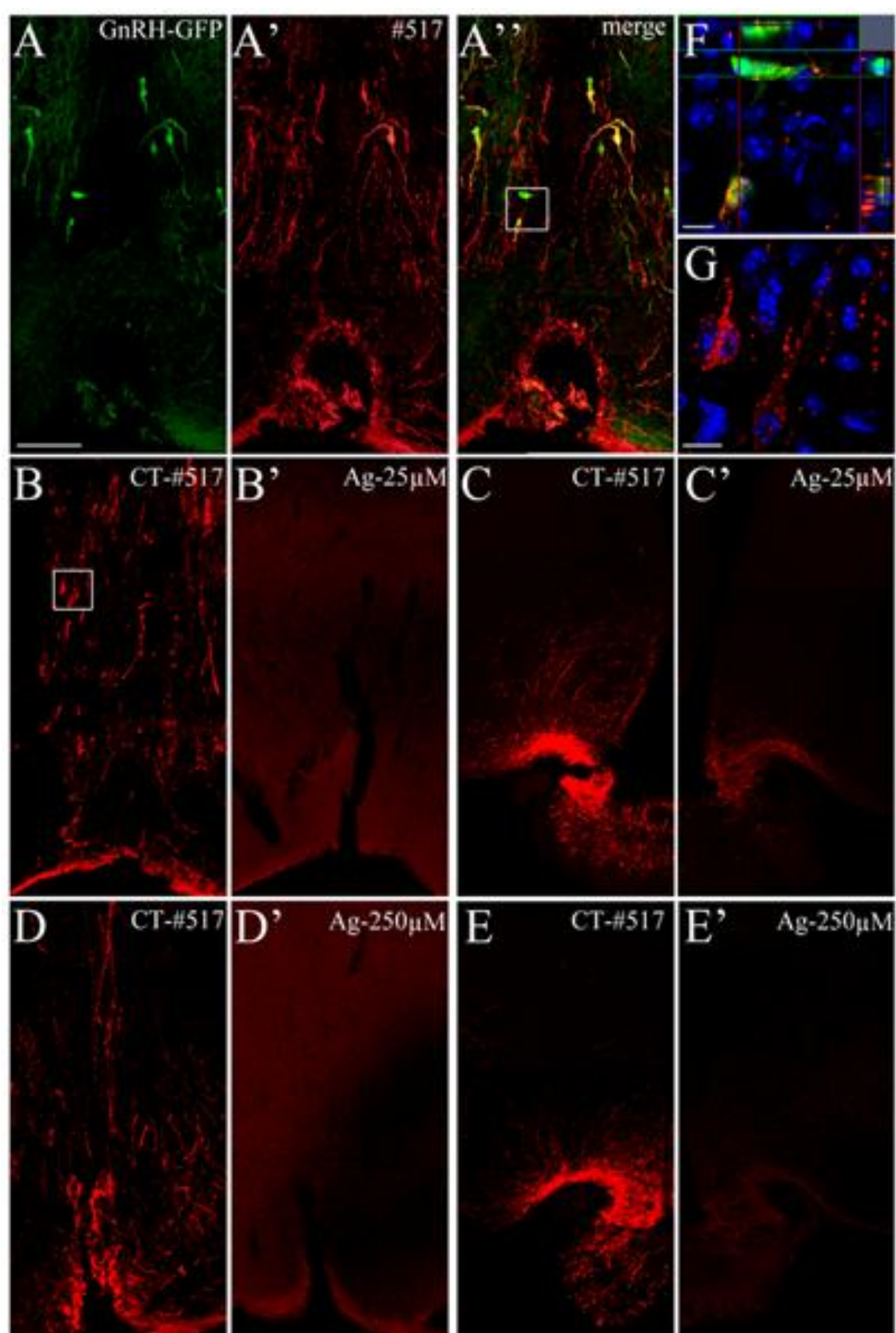


Figure 2 : Caractérisation immunohistochimique de l'anticorps GnRH-I #517 sur des coupes frontales de cerveaux de souris adultes. (A-A'') Immunoréactivité des corps cellulaires GnRH-GFP à l'anticorps GnRH-I#517 dans l'APO. (B-E) Immunoréactivité à l'anticorps anti-GnRH-I#517 sur des coupes consécutives de l'APO (B, B' et D, D') et d'EM (C, C' et E, E') marqués avec l'anti-GnRH-I#517 dans des conditions témoin (CT) et après pré-absorption avec 25µM de GnRH-I (B', C') et 250µM de GnRH-I (D', E'). (F) Plan focal en Z-compilé (Z=0,5µm) illustrant un co-marquage de corps cellulaires GnRH-GFP et GnRH-I#517-ir et correspondant à un grossissement de l'encadré de l'image A''. (G) Compilation de plans focaux (8µm) illustrant le marquage ponctiforme des corps cellulaires et des fibres GnRH-I#517-ir, et correspondant au grossissement de l'encadré de l'image B. Echelles : (A-E) : 100µm, (F, G) :10µm

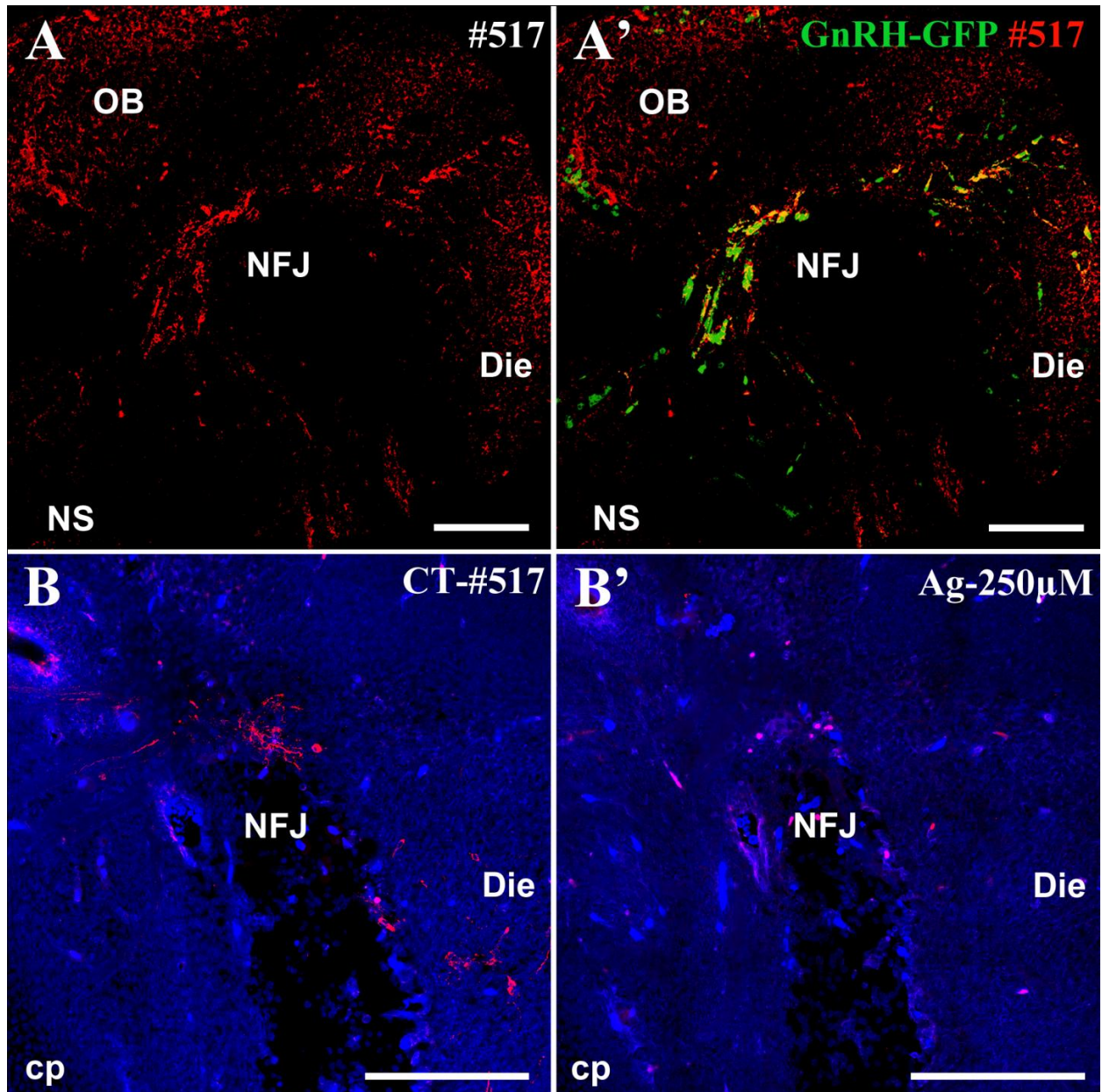


Figure 3 : Caractérisation immunohistochimique de l'anticorps GnRH-I #517 sur des coupes sagittales de tête d'embryons âgés de E15,5. (A-A') Immunoréactivité à l'anticorps GnRH-I#517 des corps cellulaires GnRH-GFP au niveau de la jonction naso-cérébrale (NFJ) et dans le Diencephale (Die). (B-B') Immunoréactivité à la GnRH-I sur des coupes consécutives de têtes d'embryons marquées avec l'anti-GnRH-I#517 dans des conditions témoins (CT-#517, B) et après pré-absorption avec 250µM de GnRH-I (Ag-250µM, B'). OB : bulbe olfactif, NS : septum nasal, cp : lame criblée de l'ethmoïde. Echelle : 200µm

La pré-absorption du sérum GnRH-I #517 avec 250µM de GnRH-I sur des coupes consécutives, abolit le marquage dans le NS (non illustré), au niveau de la NFJ et au niveau du diencéphale (**Figure 3B'**).

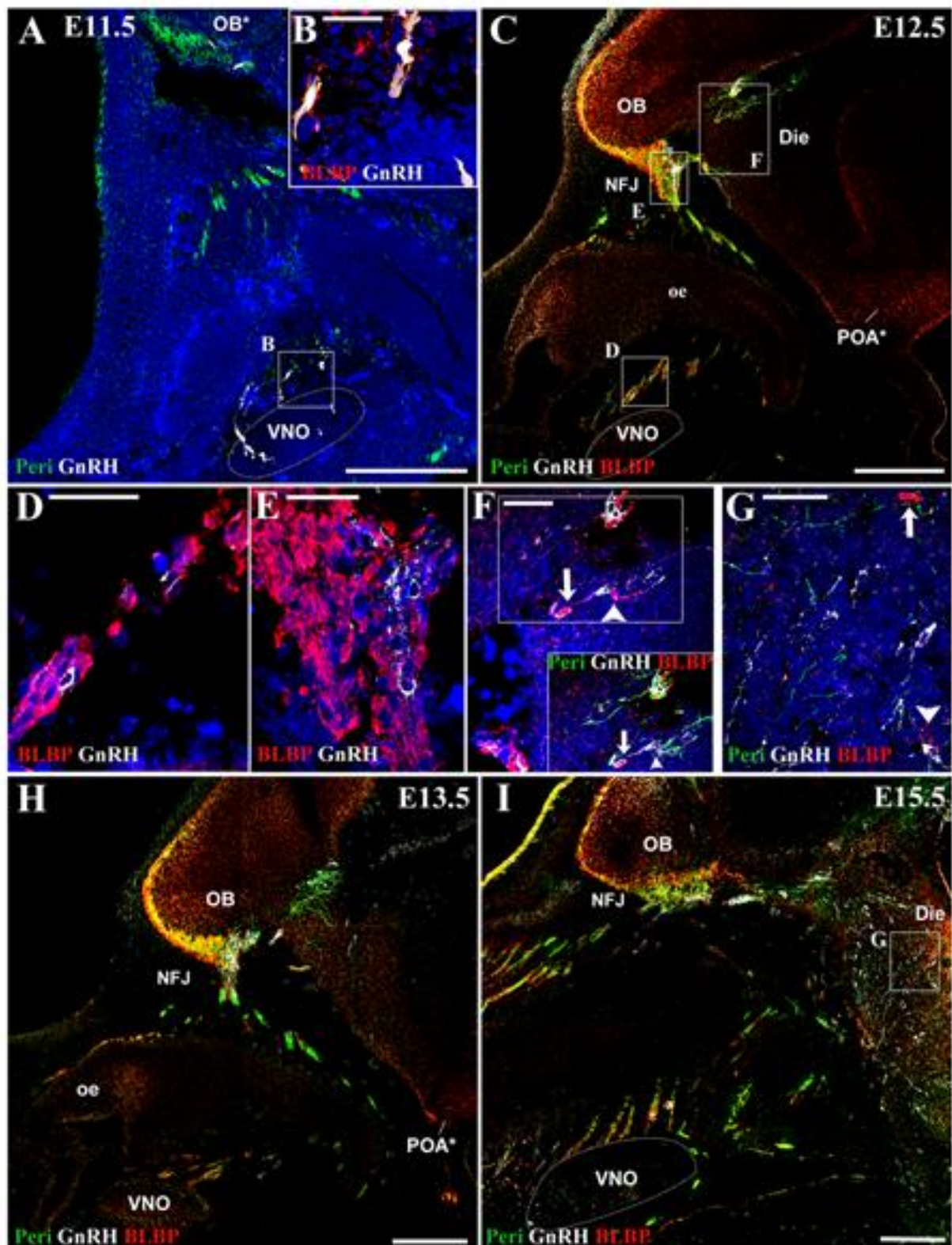
Caractérisation de l'environnement des progéniteurs gliaux BLBP-ir des neurones à GnRH-I en migration

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'environnement de progéniteurs gliaux BLBP-ir des neurones à GnRH-I à E11,5 (n=3), E12,5 (n=4), E13,5 (n=7) et E15,5 (n=7).

A E11,5, la faible intensité de l'immunomarquage du GnRH-I réalisé à partir du sérum GnRH-I#517 nous a obligé à utiliser des souris transgéniques GnRH-GFP. Ainsi, on observe que la majorité des neurones à GnRH-GFP-ir sont dans le VNO (**Figure 4A**). Seuls les neurones qui ont entamé la migration nasale le long d'axones périphérique-ir (**Figure 4A**) présentent un environnement de progéniteurs d'OEC (pOEC) BLBP-ir (**Figure 4B**). A ce stade, l'immunoréactivité de la BLBP est faible et est principalement de type fibrillaire (**Figure 4B**). Les neurones GnRH-GFP détectés dans l'organe voméronasal (**Figure 4A**) ne présentent pas d'environnement glial BLBP-Ir (**Figure 4B**).

Figure 4 : Environnement glial BLBP-Ir des neurones à GnRH-I le long des axones voméronasaux et du nerf terminal sur des coupes para-sagittales d'embryons âgés de E11,5 à E15,5. (A, C, I, J) Coupes para-sagittales de têtes d'embryons illustrant les progéniteurs OEC BLBP-ir associés aux neurones GnRH-I le long des axones périphérine-Ir (peri). (B, D-G) Grossissements des zones encadrées sur les photographies A, C et I (Z=2,5µm). B, D, E ,F illustrent les cellules BLBP-ir associées aux neurones à GnRH-I à la sortie du VNO à E11,5 (B) et E12,5 (D), au niveau de la jonction naso-cérébrale (NFJ) à E12,5 (E), au niveau de la jonction entre le télencéphale et diencéphale à E12,5 (F). F-G illustrent, dans le diencéphale, la présence de cellules BLBP-ir à proximité de cellules GnRH-ir (tête de flèche) et le long de fibres périphérine-ir (flèche) à E12,5 (F) et E15,5(I). Les noyaux sont colorés en bleu. OB : bulbe olfactif, oe : épithélium olfactif, POA : aire pré- optique, Die : diencéphale, (*) : désigne les structures présomptives. Echelles : (A, C, H, I) 200µm (B, D-G) 40µm.

Figure 4



Dès E12,5, nous pouvons observer le long d'axones périphérine-ir, des cellules GnRH-I-ir associées aux cellules BLBP-ir, dans le septum nasal dès la sortie du VNO, au niveau de la jonction naso-cérébrale (NFJ) jusqu'à la jonction entre le bulbe olfactif (OB) et le diencéphale (die) (Figure 4C). A la sortie du VNO, le long des axones périphérine-ir (**Figure 4C**), les neurones immunoréactifs à la GnRH-I sont engainés par des corps cellulaires et des fibres BLBP-ir (**Figure 4D**). Ainsi ces cellules BLBP-ir semblent former des « rails » dans le septum nasal (**Figures 4D, 4C**). Au niveau de la jonction naso-cérébrale (NFJ), on peut observer une masse cellulaire BLBP-ir dans laquelle sont détectées des grappes de neurones immunoréactifs à la GnRH-I (**Figures 4C, E**). En quantité moindre, on observe également des corps cellulaires BLBP-ir jusqu'au niveau de la jonction entre la vésicule du télencéphale et la partie proximale du diencéphale (**Figures 4C, 4F**). En effet, au niveau de la partie ventrale du bulbe olfactif, on observe la présence de quelques corps cellulaires BLBP-ir le long de fibres périphérine-ir (**Figure 4F**). La morphologie fusiforme de ces cellules BLBP-ir s'apparente à celle observée dans le système olfactif périphérique (**Figure 4F** versus **Figure 4D**). Les neurones GnRH-I-ir détectés dans cette région sont également associés à des corps cellulaires BLBP-ir (tête de flèche, **Figure 4F**) et des fibres BLBP-ir (**Figure 4F**).

A E13,5 et E15,5, on observe également la présence de cellules BLBP-ir , le long des axones périphérine-ir dans le septum nasal (**Figure 4H** et **4I**), dès la sortie du VNO (Figure 4H et 4I, Figure 5A, 5C), ainsi qu'au niveau de la NFJ (**Figure 4H** et **4I**, **Figure 5E**) et le long des axones qui longent la partie ventrale du OB (**Figure 4I**, **Figure 5G**). A E13,5 dans le septum nasal, on constate une association étroite entre les cellules BLBP-ir et les corps cellulaires GnRH-ir (**Figure 5B, B'**) et avec leurs prolongements cytoplasmiques (Flèche, **Figure 5B**). Cette proximité est également observée dans les trois plans de l'espace, au niveau de la NFJ, entre les corps cellulaires GnRH-ir et les corps cellulaires BLBP-ir et/ou les fibres BLBP-ir (**Figure 5F, F'**). A E15,5 on peut observer dans le NS (**Figure 5D, D'**) et au niveau de la NFJ (non illustré) un manchon de cellules BLBP-ir engainant les corps cellulaires GnRH-Ir. Les grappes de neurones immunoréactifs à la GnRH-I qui migrent dorsalement au OB sont également associées à des cellules BLBP-ir, jusqu'à la jonction avec le diencéphale (Figure 5G, G'). A ce stade, dans le diencéphale, on peut observer la présence de cellules fusiformes BLBP-ir le long de prolongements périphérine-ir (Flèche, **Figure 4G**), mais également à proximité de neurones GnRH-I (Tête de flèche, **Figure 4G**).

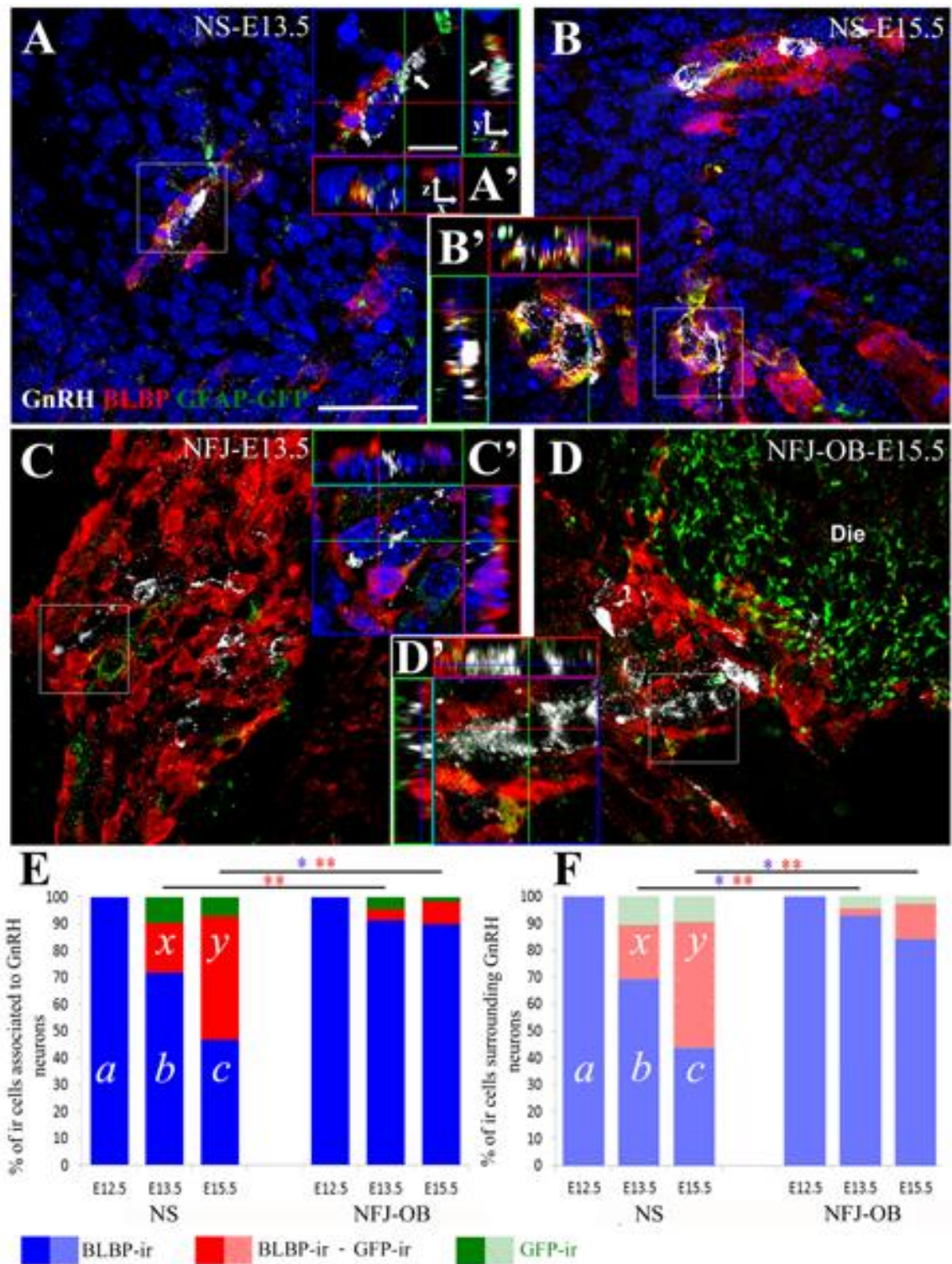
Ainsi, on observe un environnement BLBP-ir des neurones à GnRH-I dès E11,5 à la sortie du VNO. Entre E12,5 et E15,5 une association étroite des deux types cellulaires se met en place le long des axones du VNO jusqu'à la jonction entre le bulbe olfactif et le diencéphale.

Caractérisation de l'évolution spatio-temporelle du phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I

Pour caractériser l'évolution du phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I en migration, nous avons utilisé un marqueur de progéniteurs des OEC : la BLBP, et un marqueur d'OEC tardif : la GFAP. Nous avons distingué deux régions d'intérêt : i) la voie de migration olfactive qui correspond à la zone de migration rostrale des neurones à GnRH-I *i.e.* le septum nasal (NS) délimité par le VNO et la lame criblée de l'ethmoïde; ii) la zone de transition entre le septum nasal et le diencéphale, où les neurones à GnRH-I s'orientent ventralement avant d'entamer leur migration tangentielle dans le système nerveux central. Cette zone comprend donc la jonction entre le septum nasal et la vésicule télencéphalique (NFJ) ainsi que le passage à travers cette vésicule, qui se différenciera en bulbe olfactif (OB).

Figure 5 : Evolution spatio-temporelle du phénotype de l'environnement glial des neurones à GnRH-I en migration dans le septum nasal (NS) et au niveau de la jonction (NFJ-BO*) de E12,5 à E15,5. (A, C, E, G) compilation de plans focaux illustrant l'environnement glial BLBP-ir et GFAP-GFP-ir des neurones GnRH-I-ir dans le NS à E13,5 (A) et E15,5 (C), au niveau de la jonction naso-cérébrale (NFJ) à E13,5 (E), et au niveau de la jonction entre le bulbe olfactif (BO) et le diencéphale (Die) à E15,5 (G). (B-B'', D-D'', F, H) Représentation en 3D (Z-stack) des grossissements des zones encadrées en A, C, E, G. Les noyaux sont colorés en bleu. Echelles : (A, C, E, G) : 50µm, (B-B'', D-D'', F, H) : 10µm. (I, J) Histogramme représentant la proportion des cellules BLBP-ir , BLBP-GFP-ir et GFP-ir associées aux neurones à GnRH-I (I) et environnantes aux neurones à GnRH-I, sur une surface de 155µm² (J) au niveau du NS et de la zone comprenant la NFJ et le OB à E12,5 (n=3), E13,5 (n=5) et E15,5 (n=4). Les différences statistiques inter-régions sont désignées par des étoiles : (*) pour les cellules BLBP-ir, () pour les cellules BLBP-GFP-ir. Les différences statistiques inter-stades**

Figure 5



Contrairement à l'immunofluorescence de la BLBP qui est détectée à E11,5, celle de la GFAP-GFP est détectée dans le septum nasal à partir de E13,5 (**Figures 5A et 5I**). A E13,5, seule une faible proportion de cellules GFAP-GFP simplement marquées est associée aux neurones à GnRH-I dans le septum nasal ($7,7 \pm 3,7\%$ **Figure 5B'', 5I**). Dans cette région, $15 \pm 4,8\%$ des cellules GFAP-GFP-ir associées aux neurones à GnRH-I co-expriment la BLBP (**Figure 5B et 5I**). Au niveau de la NFJ-OB une faible proportion de cellules GFAP-GFP-ir simplement marquées et doublement marquées, avec la BLBP, est mise en évidence ($5,7 \pm 2,5\%$ *versus* $3,3 \pm 1,7\%$, **Figure 5E, 5F, 5I**). Les cellules BLBP simplement marquées représentent la glie majoritairement associée aux neurones à GnRH-I dans le NS ($77,4 \pm 7,6\%$, **Figures 5A-B', 5I**) et dans la NFJ-OB ($91 \pm 3,6\%$, **Figures 5E, 5F, 5I**).

A E15,5, on détecte un grand nombre de cellules GFAP-GFP-ir dans le septum nasal (**Figure 5C**). La majorité de ces cellules GFAP-GFP associées aux neurones à GnRH-I sont doublement marquées à la BLBP ($46,4 \pm 5,3\%$, **Figures 5D et 5I**). Les cellules GFAP-GFP simplement marquées représentent $6,5 \pm 1,7\%$ des cellules gliales associées à ces neurones (**Figure 5D'', 5I**). Au niveau de la NFJ-OB, les cellules BLBP simplement marquées représentent $89,8 \pm 5,06\%$ des cellules gliales associées aux neurones immunoréactifs à la

GnRH-I (**Figure 5H, 5I**). $8,3 \pm 5,1\%$ des cellules gliales associées à ces neurones sont doublement-immunoréactives à la GFP et à la BLBP (**Figures 5H, 5I**).

Ainsi, entre E12,5 et E15,5, nous observons une différence significative de la proportion de cellules doublement immunoréactives, à la GFAP-GFP et à la BLBP, entre les stades ($p \leq 0,001$), mais également entre les deux régions analysées, le septum nasal et la jonction nasao-cérébrale ($p \leq 0,001$). Une différence significative de la proportion de cellules mono-marquées à la BLBP est également mise en évidence entre les stades ($p \leq 0,002$) et entre ces deux régions (two way ANOVA, $p \leq 0,001$). En ce qui concerne les cellules mono-marquées GFAP-GFP-ir, nous n'observons pas de différence significative entre les stades et les régions. L'ANOVA à deux variables nous permet de mettre en évidence une interaction entre les deux facteurs (régions et stades de développement) pour les deux premiers types cellulaires, à $p \leq 0,01$ pour les cellules BLBP-ir et à $p \leq 0,0005$ pour les cellules doublement immunoréactives. Ainsi l'évolution du phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I au cours du développement embryonnaire (entre E12,5 et E13,5) dépend de leur localisation (entre le NS et la NFJ-OB). De même, les différences de phénotypes présents dans ces 2 régions dépendent du stade de développement.

Afin d'identifier les groupes intéressés par ces différences statistiques, nous avons entrepris des analyses deux à deux (Figure 5E). Nous avons comparé les différences de proportion de chaque phénotype antigénique glial entre les deux régions d'intérêt. A E13,5 on observe, une proportion de cellules BLBP-ir qui tend à diminuer ($p=0,08$) entre le NS et la NFJ-OB. Cette diminution est corrélée avec une augmentation significative de la proportion de cellules doublement-ir (BLBP-ir et GFP-ir) dans le septum nasal (**Figure 5I**). A E15,5, on observe une diminution significative de la proportion de cellules BLBP-ir entre le NS et la NFJ-OB (**Figure 5I**) et une augmentation significative de la proportion de cellules doublement-ir (BLBP-ir et GFP-ir) (**Figure 5I**). Nous nous sommes intéressés aux différences de proportions de chaque phénotype antigénique glial en fonction du stade de développement pour chaque région. Dans le septum nasal, on observe une diminution significative du nombre de cellules BLBP-ir entre E12,5 et E13,5 (**Figure 5I**) et entre E13,5 et E15,5 (**Figure 5I**). Cette diminution de la proportion de cellules BLBP-ir est corrélée avec une augmentation du nombre de cellules qui co-expriment la GFAP (**Figure 5I**). Au niveau de la NFJ-OB, la proportion de cellules gliales simplement marquées (BLBP-ir) et doublement marquées associées aux neurones à GnRH-I, ne présentent pas de différences significatives entre les trois stades de développement, bien que l'on commence à détecter des cellules GFP-ir à partir de E13,5. Ces résultats montrent donc que le phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I évolue différemment en fonction de la région. Au cours du développement, la population de cellules exprimant la GFAP devient plus importante dans le septum nasal qu'au niveau de la zone de transition entre la lame criblée de l'éthmoïde et le diencéphale. Ces résultats suggèrent également que le phénotype des cellules gliales engainant ces neurones à GnRH-I dans le septum nasal change entre E12.5 et E15.5 en favorisant l'expression de la GFAP.

Quantification du microenvironnement glial BLBP-ir et/ou GFAP-GFP-ir associé aux neurones à GnRH-I en migration

Nous avons vérifié si les changements du phénotype antigénique des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I impliquaient une variation de la proportion de cellule gliale associée à ces neurones en fonction de la région et du stade de développement. Nous avons donc quantifié le microenvironnement glial pour chaque neurone à GnRH-I et l'avons comparé en fonction des régions et du stade de développement (**Tableau 1**). Nous avons mis en évidence qu'en moyenne $65,5 \pm 2$ % des cellules (non GnRH-I) associées aux neurones à

GnRH-I sont des cellules gliales BLBP-ir et/ou GFP-ir. On observe également que ce pourcentage de cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I reste constant (entre 60% et 70%) aux différents stades de développement et dans les deux régions étudiées (**Tableau 1**). Nous avons également mis en évidence qu'en moyenne $91,9 \pm 1,7\%$ des neurones à GnRH-I sont associés à au moins une cellule gliale BLBP-ir et/ou GFAP-GFP-ir quelle que soit la région (NS et NFJ-OB) et le stade (de E12.5 à E15.5). Cette association reste constante ($\pm 90\%$) entre les stades et les régions (**Tableau 1**). Parmi les 8% de neurones à GnRH-I non associés à au moins une cellule gliale, 5,8% sont associés à des neurones à GnRH-I dont $3 \pm 0,76\%$ sont associés à au moins une cellule gliale.

Ces résultats montrent l'importance du microenvironnement glial associé aux neurones à GnRH-I. Cet environnement concerne non seulement plus de 90% des neurones à GnRH-I-ir, mais il compose également le microenvironnement principal ($>60\%$) de ces neurones, aux trois stades de développement et dans les deux régions étudiées.

Caractérisation de l'évolution spatio-temporelle du phénotype de l'environnement glial des neurones à GnRH-I

Nous avons vérifié si la répartition des différents phénotypes est spécifique aux cellules qui sont associées aux neurones à GnRH-I ou si elle reflète l'environnement glial qui colonise ces régions à ces stades de développement. Nous avons donc quantifié le nombre de cellules GFP-ir, BLBP-ir et BLBP-GFP-ir dans les deux régions d'intérêts (NS et NFJ-OB) à ces trois stades sur une surface de $155\mu\text{m}^2$ centrée sur les neurones à GnRH-I (**Figure 5J**).

A E13,5, nous observons une augmentation statistiquement significative de la proportion de cellules BLBP simplement marquées entre le NS et NFJ-OB ($69,1 \pm 8\%$ *versus* $92,9 \pm 3,6\%$, (**Figure 5J**), contrairement à la tendance observée pour les cellules gliales associées aux neurones à GnRH.

La même observation est faite à E15,5 ($43,7 \pm 6\%$ *versus* $84,04 \pm 8,2\%$, (**Figure 5J**). Dans le NS, la proportion de cellules BLBP-ir diminue significativement entre E12,5, E13,5 ($69,1 \pm 8\%$) et E15,5 ($43,7 \pm 6\%$) (**Figure 5J**). Cette diminution est corrélée avec l'augmentation significative de cellules BLBP-ir et GFAP-GFP-ir entre E13,5 ($20,2 \pm 6,7\%$) et E15,5 ($46,8 \pm 6,3\%$) (**Figure 5J**). Une faible proportion de cellules doublement positives est détectée dans le NFJ-OB à chaque stade : $2,7 \pm 1,5\%$ à E13,5 et $13 \pm 8,3\%$ à E15,5 (**Figure 5J**).

Stades de développement embryonnaire	E12,5		E13,5		E15,5	
Régions	NS	NFJ-OB	NS	NFJ-OB	NS	NFJ-OB
% de cellules gliales associées par neurone à GnRH-I	65,8±4,6	62,5±5,4	61,8±6,7	73,8±8,7	61,3±1,6	66,8±1,8
% de neurones à GnRH-I associés à au moins une cellule gliale	90,3±5,7	86±0,74	91±6,03	93±4,5	96,3±2,2	93±1,6

Tableau 1 : Tableau représentant l'importance quantitative du microenvironnement gliale des neurones à GnRH-I en migration dans le septum nasal (NS) et au niveau de la jonction naso-cérébrale (NFJ-OB) de E12,5 et E15,5. Représentation en Moyenne ± ESM

Cette proportion de cellules doublement marquée est significativement moins importante au niveau de NFJ-OB que dans la NS à E13,5 et E15,5 (**Figure 5J**).

Discussion

Afin d'étudier l'implication des cellules gliales olfactives engainantes dans l'ontogenèse des neurones à GnRH-I, il est important de pouvoir les caractériser au cours du temps. Or l'évolution spatiale et temporelle des formes précoces et matures de ces cellules gliales n'ont pas encore été caractérisées. Dans cette étude nous mettons en évidence un changement net du phénotype des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I entre E11,5 et E15,5 dans le septum nasal avec une diminution significative de la détection de la BLBP et une augmentation significative de la détection de la GFAP-GFP. Les cellules BLBP-ir représentent la population gliale majoritairement détectée aux trois stades de développement au niveau de la jonction naso-cérébrale et du bulbe olfactif.

Les neurones à GnRH-I sont associés à des cellules gliales immatures de la sortie de l'organe voméronasal à l'entrée du diencéphale

Dans cette étude, nous décrivons pour la première fois la répartition de progéniteurs de cellules olfactives engainantes (pOEC) BLBP-immunoréactives dans le système olfactif accessoire au cours du développement embryonnaire de souris âgées de E11,5 à E15,5. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés au trajet migratoire des neurones à GnRH-I, c'est-à-dire : i) des nerfs voméronasaux qui proviennent de l'organe voméronasal et qui passent ventro-dorsalement et médialement au bulbe olfactif principal (Farbman et Squinto et al 1985) ii) et du nerf terminal qui se projette de la sortie de l'épithélium du VNO jusqu'au diencéphale, en passant au niveau de la surface ventro-médiale du bulbe olfactif et en traversant la région olfactive rostrale et le septum ((Wirsig-Wiechmann and Oka 2002)-Wiechmann 2002). Le profil d'expression de la BLBP a été décrit au cours du développement dans le système olfactif principal (Anthony et al., 2004; Murdoch and Roskams 2007, (Miller et al. 2010) (Carson et al., 2006; Murdoch & Roskams 2008) ; partie latérale du système olfactif et qui comprend l'épithélium olfactif, les axones olfactifs et la couche des nerfs olfactifs (ONL) .

Dans l'épithélium du VNO, nous ne détectons pas de pOEC BLBP-ir de E11,5 à E15,5. Cette observation est en accord avec les données de Murdoch et Roskams (2007, 2008) qui ne mettent pas en évidence de progéniteurs des cellules gliales engainantes exprimant la BLBP

dans l'épithélium olfactif et dans l'épithélium de VNO chez la souris à E10,5 et E13,5. En effet seules des cellules multipotentes de type glie radiaire (RGPL), positives à la nestine, sont retrouvées dans ce tissu au cours du développement embryonnaire (Murdoch and Roskams 2007; Murdoch and Roskams 2008).

Dans le septum nasal (SN) et au niveau de la jonction naso-cérébrale (NFJ), nous observons la présence de pOEC BLBP-ir le long des axones dès E11,5, dans les nerf voméronasaux et/ou le nerf terminal. Ces pOEC engainent les neurones à GnRH-I dans le SN dès E11,5 et dans le NFJ dès E12,5. La présence de pOEC BLBP-ir, est décrite dans le système olfactif principal, aux stades précoces de développement, le long des axones olfactifs (Murdoch et Roskams 2007, Murdoch et Roskams 2008, Miller 2010)(Carson et al. 2006) (Ritcher et Roskams 2007) et au niveau de l'ONL (Blanchart et al 2011). Nous observons donc au cours du développement embryonnaire une similarité de la répartition des pOEC entre les systèmes olfactifs accessoire et principal.

Dans la vésicule télencéphalique (bulbe olfactif présomptif) nous détectons également des pOEC BLBP-ir engainants les neurones à GnRH-I le long des axones. De nombreuses études de microscopie électronique et d'immunohistochimie suggèrent que les OEC pénètrent dans la vésicule télencéphalique au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte (Gong et al, 1994, Ubink et Hokfelt, 2000)(Marin-Padilla 1989; Valverde et al. 1992)(Lopez-Mascaraqua 1991). Récemment une étude de traçage, par injection de rétrovirus GFP dans la fosse olfactive, a mis en évidence la présence de cellules BLBP-ir et GFAP au niveau de la couche externe du BO (Blanchart et al. 2011). Parmi les études citées ci-dessus, certaines suggèrent que ces cellules occupent la capsule des glomérules olfactifs (Marin-Padilla et 1989, Valverde et Lopez-Mascaraqua 1991, Valverde et al, 1992). Dans notre étude, nous détectons des cellules BLBP-ir le long des axones, sans doute du nerf terminal, qui traversent le BO jusqu'au début du diencephale. Une étude menée par Zheng et Jourdan, (1988a) a mis en évidence par microscopie électronique un environnement glial engainant le nerf terminal au niveau de la surface bulbaire, qui s'étend ventro-caudalement jusqu'au ganglion terminal principal chez le rat adulte (Zheng and Jourdan 1988). Cette donnée en accord avec nos observations nous conforte dans l'idée que les neurones à GnRH-I sont associés à des pOEC dans le télencéphale. Elle nous laisse également supposer que ces neurones présentent ce microenvironnement glial au cours de leur migration dans le diencephale, du fait que le nerf

terminal se projet jusque dans le septum et que nous observons dans le cerveau quelques cellules BLBP-ir morphologiquement apparentées aux pOEC le long d'axones immunoréactif à la périphérine.

Les OEC du système olfactif accessoire mûrissent rostralement pendant la période de migration des neurones à GnRH-I

Dans cette étude nous avons distingué les cellules gliales qui sont associées aux neurones à GnRH-I et qui pourraient du fait de leur proximité atteindre et réguler la migration des neurones à GnRH-I de l'ensemble des cellules gliales qui colonisent le système olfactif accessoire (AOS). Cependant notre étude ne met pas en évidence de différence dans l'évolution du phénotype entre ces cellules gliales engainantes. Pour l'ensemble des OEC qui colonisent le système olfactif accessoire, nous détectons une immunoréactivité à la BLBP un jour avant l'immunoréactivité à la GFAP-GFP. Dans le système nerveux central la BLBP est également exprimée avant la GFAP-GFP (GFP sous le contrôle du promoteur humain de la *Gfap*) dans la glie radiaire (Anthony et al. 2004). Une étude de Malatesta met en évidence que la co-expression des deux marqueurs, BLBP-GFP et GFAP-GFP, est corrélée avec leur différenciation (Malatesta 2008). Dans le système olfactif périphérique la BLBP est décrit comme un marqueur de progéniteurs des OEC (Murdoch & Roskams, 2007) et la GFAP un marqueur des OEC matures (Astic et al. 1998).

Dans le septum nasal médian, la quantification des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I nous a permis de mettre en évidence une augmentation de la proportion de cellules gliales GFAP-GFP-ir et une diminution de la proportion de cellules BLBP-ir, entre E12,5 et E15,5. Dans une précédente étude, nous avons observé une augmentation de cellules GFAP-GFP-ir au cours du développement *in vivo* entre E12,5 et E15,5 et *in vitro* sur des cultures d'explants de placodes olfactives entre 3 jours et 10 jours de cultures (Geller et al. 2013). Nos résultats suggèrent donc que les cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I mûrissent au cours du développement dans le septum nasal médian. Le changement de phénotype des OEC au cours du développement et de leur maturation a été décrite dans la littérature (pour revue Ramon-Cueto et Avila 1997). Dans le système olfactif principal, la détection de marquage S100 β (marqueur des OEC en cours de maturation) a été mise en évidence plus précocement que le marquage GFAP dans le septum nasal de rat (Astic 1998). Cette étude décrit également

une augmentation du marquage de la GFAP le long des axones voméronasaux et olfactifs au cours du développement embryonnaire (Astic 1998).

Au niveau de la partie médiane de la jonction naso-cérébrale (NFJ) et au niveau ventro-médian du bulbe olfactif nous observons un faible pourcentage de cellules exprimant la GFAP par apport aux cellules qui colonisent le septum nasal médian. Au niveau du système olfactif principal, de nombreuses études mettent en évidence un faible marquage de la GFAP, voire un marquage inexistant, dans la couche de nerfs olfactifs (ONL) par apport aux cellules qui colonisent le septum nasal (Astic 1998, Valverde 1992, Carson 2006, Wang 2002, Blanchart 2011, Barnett 1993, Franceschini et al 1996, Reinhard et al 1998).

Dans la NFJ-OB nous observons cependant une légère augmentation, non significative, de l'expression de la GFAP corrélée avec une légère diminution de cellules BLBP-ir entre E13,5 et E15,5. Il est donc difficile de conclure quant à une possible maturation tardive des OEC colonisant cette région. Dans l'ONL, une légère augmentation de marquage GFAP a également été décrite au cours développement embryonnaire tardif et post-natal chez (Carson 2006, Wang 2002, Astic 1998). L'étude de Astic et al. (1998) qui montre une augmentation de marquage de la GFAP entre E16-E18 dans le septum nasal et entre P1-P5 au niveau de l'ONL conclut à un gradient de maturation rostro-caudale des OEC du système olfactif principal.

Selon notre étude nous pouvons conclure que l'on observe une maturation rostrale des OEC à partir de E13,5 et que la majorité des neurones à GnRH-I en migration dans le NFJ-OB sont associés à des pOEC BLBP-ir jusqu'à leur entrée dans le diencephale. Nous pouvons expliquer la différence de répartition des phénotypes des OEC entre le SN et NFJ soit par :

- i) une migration des OEC du SN vers le NFJ-OB qui est plus lente pour les OEC exprimant la GFAP que pour les pOEC, sachant que chez la souris les premiers pOEC qui composent la masse migratoire quittent l'EO vers E10,5 et arrivent à la base de la vésicule télencéphalique un jour plus tard (Marin Pedilla et Amieva 1989, Valverde 1992)
- ii) un délai de maturation différent entre deux sous-populations d'OEC, une qui occupe le NS et l'autre le NJF. En effet on peut supposer que les cellules en cours de maturation, GFAP-GFP-ir et BLBP-ir, arrêtent de migrer et colonisent le septum nasal ; en effet, selon Astic et al. (1998) la GFAP augmenterait la rigidité du

cytosquelette. Ainsi seuls les progéniteurs des OEC migreraient et accompagneraient les neurones à GnRH-I jusqu'au télencéphale, la BLBP étant décrite comme un modulateur de la migration neuronale (Liv 2010).

L'environnement cellulaire des neurones à GnRH-I en migration

Dans cette étude nous mettons en évidence que l'environnement glial concerne une grande majorité des neurones à GnRH-I et que celui est également quantitativement majoritaire.

En effet, plus de 90% des neurones sont associés à des cellules gliales (BLBP-ir et/ou hGFAP-GFP-ir) aux trois stades étudiés et au niveau des deux régions d'intérêts. Parmi les 8% restant, 6% sont des neurones à GnRH-I associés à d'autres neurones à GnRH-I, ce que l'on explique par le fait que ces neurones migrent en grappes (Wray et al 1989, Schwanzel-Fukuda 1989).

Nous mettons également en évidence que plus de 60% des cellules associées aux neurones à GnRH-I sont des cellules gliales (BLBP-ir et/ou hGFAP-GFP-ir). Nous pouvons supposer que les 40% de cellules associées à ces neurones pourraient être des cellules qui composent la masse migratoire. En effet les OEC et les neurones à GnRH-I ne sont pas les seules cellules qui proviennent de la fosse nasale et qui migrent vers le télencéphale au cours du développement embryonnaire (Valverde et al 1992). Plusieurs types de cellules composent cette masse et pourraient être associées aux neurones à GnRH-I en migration.

Les cellules OMP-ir (Olfactory Maker Protein), qui sont décrites pour migrer principalement le long de la partie latérale du système olfactif et ventro-rostralement au télencéphale (De Carlos et al 1995, De Carlos 1996, Pellier et Astic 1994, Farbman et al 1993, Valverde et al 1993, Terrazo et al 1995), ont également été mises en évidence en association étroite avec des neurones à GnRH-I en migration, dans le cerveau d'opossum (Terrazo et al 1995).

Les cellules immunoréactives à l'acétylcholinestérase (AChE), qui migrent à travers le septum nasal antérieurement par rapport aux neurones à GnRH-I (DeCarlos et al 1995), sont également connus pour composer le nerf terminal (Caldani 1987, Wirsig et Gatchell 1986, Schwanzel-Fukuda et Silverman 1980, Schwanzel-Fukuda 1987, Zheng 1988b). Elles pourraient de ce fait, faire partie du microenvironnement cellulaire des neurones à GnRH-I en migration.

Il est également mis en évidence une migration de cellules catécholaminergiques (CA) immunoréactives à la tyrosine hydroxylase (TH), le long du septum nasal chez le mouton

(Izvol'skaia et al 2006) le rat (Izvol'skaia et al 2009) et l'humain (Verney 1996). Il a été mis en évidence, une proximité étroite des cellules TH-ir et des neurones à GnRH-I dans le cerveau d'embryon humain (Verney 1996) et une apposition étroite entre les neurones à GnRH-I et les fibres CA à l'entrée du cerveau chez le rat (Izvol'skaia et al 2009). Cette dernière étude met également en évidence chez les fœtus de rats déficient en CA, une augmentation du nombre de cellules GnRH-ir dans le septum nasal suggérant un rôle des CA dans la migration des neurones à GnRH-I (Izvol'skaia et al 2009).

Enfin le nerf terminal serait également composé de neurones « like » NPY (pour revue Wirsig-Wiechmann 2002) qui seraient en relation étroite avec les neurones à GnRH-I chez la chauve souris (Oelschlager H.A.1998). Le fait que le NPY soit également exprimé par les OEC (Ublink et Hokfely 2000) ne nous permet pas d'exclure que certaines de ces cellule sont des cellules NPY+ gliales engainantes.

En conclusion, cette étude met en évidence que les neurones à GnRH-I sont associés aux progéniteurs des cellules olfactives engainantes de la sortie du voméronasal à la jonction entre le bulbe olfactif et le diencephale. La maturation des cellules gliales est mise en évidence dans la partie proximale du système olfactif accessoire pendant la période de migration des neurones à GnRH-I entre 12,5 et 13,5 jours de développement embryonnaire. Les cellules gliales qui accompagnent les neurones à GnRH-I dans le cerveau sont quand à elles immatures. De plus les cellules gliales immatures forment le microenvironnement majoritaire de ces neurones en migration.

Remerciement

Les auteurs tiennent à remercier Marine Cirot, Déborah Crespin et Claude Cahier de l'unité expérimentale de l'INRA, Centre de Tours (UE-PAO), pour prendre soin des animaux. Ce travail a été soutenu par des subventions du «Agence Nationale pour la Recherche" (ANR-NÉCESSITÉ: effets neuroendocrines des perturbateurs endocriniens) et de la "Région Centre" (programme ToxEmergenCe). Sarah Geller a reçu une subvention doctorat de l'"Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche". Les auteurs n'ont pas de conflit d'intérêt à déclarer

References

- Anthony, T.E. & Heintz, N. (2007) The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects. *J Comp Neurol*, **500**, 368-383.
- Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G. & Heintz, N. (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*, **41**, 881-890.
- Astic, L., Pellier-Monnin, V. & Godinot, F. (1998) Spatio-temporal patterns of ensheathing cell differentiation in the rat olfactory system during development. *Neuroscience*, **84**, 295-307.
- Carson, C., Murdoch, B. & Roskams, A.J. (2006) Notch 2 and Notch 1/3 segregate to neuronal and glial lineages of the developing olfactory epithelium. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **235**, 1678-1688.
- Feng, L., Hatten, M.E. & Heintz, N. (1994) Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron*, **12**, 895-908.
- Jasoni, C.L., Porteous, R.W. & Herbison, A.E. (2009) Anatomical location of mature GnRH neurons corresponds with their birthdate in the developing mouse. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **238**, 524-531.
- Miller, A.M., Treloar, H.B. & Greer, C.A. (2010) Composition of the migratory mass during development of the olfactory nerve. *J Comp Neurol*, **518**, 4825-4841.
- Murdoch, B. & Roskams, A.J. (2007) Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology. *J Mol Histol*, **38**, 581-599.
- Murdoch, B. & Roskams, A.J. (2008) A novel embryonic nestin-expressing radial glia-like progenitor gives rise to zonally restricted olfactory and vomeronasal neurons. *The*

Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, **28**, 4271-4282.

- Negoescu, A., Labat-Moleur, F., Lorimier, P., Lamarcq, L., Guillermet, C., Chambaz, E. & Brambilla, E. (1994) F(ab) secondary antiOBdies: a general method for double immunolabeling with primary antisera from the same species. Efficiency control by chemiluminescence. *J Histochem Cytochem*, **42**, 433-437.
- Pellitteri, R., Spatuzza, M., Stanzani, S. & Zaccheo, D. (2010) Biomarkers expression in rat olfactory ensheathing cells. *Front Biosci (Schol Ed)*, **2**, 289-298.
- Schwanzel-Fukuda, M., Bick, D. & Pfaff, D.W. (1989) Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res*, **6**, 311-326.
- Spergel, D.J., Kruth, U., Hanley, D.F., Sprengel, R. & Seeburg, P.H. (1999) GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci*, **19**, 2037-2050.
- Valverde, F., Santacana, M. & Heredia, M. (1992) Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. *Neuroscience*, **49**, 255-275.
- Wierman, M.E., Kiseljok-Vassiliades, K. & Tobet, S. (2010) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: Initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function. *Front Neuroendocrinol*.
- Wray, S. (2010) From nose to brain: development of gonadotrophin-releasing hormone-1 neurones. *J Neuroendocrinol*, **22**, 743-753.

IV. Conclusion du chapitre I

Les résultats présentés dans ce chapitre permettent d'affirmer que les neurones à GnRH-I en migration présentent un environnement glial. Ces cellules gliales et/ou progéniteurs gliaux sont présents dès le début de la migration neuronale aussi bien *in vitro* (dès 3 jours de cultures) que *in vivo* (dès 11,5 jours de développement embryonnaire). Elles sont présentes tout le long de la route migratoire des neurones à GnRH-I, du VNO à l'entrée du diencéphale, et sont étroitement associées à ces neurones. Elles représentent le microenvironnement cellulaire majoritaire des neurones à GnRH-I en migration et expriment des marqueurs connus pour être impliqués dans la migration de ces neurones. Toutes ces données suggèrent un rôle de ces cellules gliales dans la migration de ces neurones.

La caractérisation phénotypique de ces cellules gliales nous a permis de les identifier en tant que cellules gliales olfactives engainantes (OEC). Ces cellules gliales présentent une grande variabilité phénotypique *In vivo*, cette variabilité se traduit par une évolution du phénotype distincte entre les cellules colonisant le septum nasal, et celles qui colonisent la jonction entre ce septum et le cerveau. Une maturation rostrale des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I au cours du développement embryonnaire est mise en évidence. Cette variabilité du phénotype expliquerait le fait que nous n'arrivons pas à déterminer si ces cellules gliales migrent jusque dans l'hypothalamus. Cependant *in vitro* nous mettons en évidence que ces cellules gliales parcourent une distance de migration plus importante que les neurones à GnRH-I. De plus, nous observons dans ce même modèle, la formation d'un réseau neuro-glial après une semaine de culture, soit à la période de maturation du profil de sécrétion.

Chapitre 2 :

Le transcriptome des cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I est-il modulé par les Perturbateurs Endocriniens ?

I. Contexte scientifique

Le développement et la régulation du réseau neuroendocrine à GnRH-I est dépendant des hormones stéroïdiennes (Clarke 2011; Herbison 1998; Parhar et al. 2012) et constitue donc une cible privilégiée pour des perturbateurs endocriniens (PE) à activité oestrogénique ou anti-oestrogénique (pour revue Gore 2010, Dickerson et Gore 2007). Ces dernières années, des études ont mis en évidence l'effet d'un PE à activité oestrogéno-mimétique, le 17- α -éthinyloestradiol (EE₂) sur le développement des neurones à GnRH-I chez la souris (Pillon et al. 2012; Vosges et al. 2012). Cet analogue synthétique du 17 β -oestradiol est utilisé dans les pilules contraceptives et les traitements hormonaux substitutifs. Ainsi, ce perturbateur endocrinien se fixerait avec une affinité élevée sur les récepteurs nucléaires aux œstrogènes ER α et ER β (Shyu et al. 2011; Vosges et al. 2012) mais les études mentionnées ci-dessus ne permettent pas d'affirmer que le mode d'action est direct sur les neurones à GnRH-I. En effet, les études menées à partir de souris ER α KO et ER β KO ont permis de mettre en évidence que les régulations physiologiques de l'oestradiol sur l'activité des neurones à GnRH-I lors des rétro-contrôles négatifs et positifs, impliquent principalement le récepteur ER α , puisque seule une déficience de ER α conduit à une dérégulation importante du phénotype endocrinien (Beauvillain 2008; Clarke 2011). Cependant la majorité des études s'accorde à dire que les neurones à GnRH-I n'exprimeraient pas le récepteur nucléaire ER α (Herbison and Pape 2001, Petersen et al 2003) et suggère que l'effet des œstrogènes sur les neurones à GnRH-I serait transmis indirectement par des cellules gliales ou endothéliales (Rage et al 1997, Smith and Jennes 2001, Prevot 2002, Petersen et al 2003). Dans ce troisième chapitre nous mettons en évidence l'expression des gènes codant pour les récepteurs nucléaires aux œstrogènes, ER α , ER β dans les cellules gliales olfactives GFAP-GFP associées aux neurones à GnRH-I. **Ces résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse que l'action de l'EE₂ sur l'ontogenèse et/ou l'activité des neurones à GnRH-I passerait par les cellules gliales en se fixant sur les récepteurs nucléaires aux œstrogènes.** Le mécanisme classique de l'activation des récepteurs nucléaires après liaison de l'hormone implique la translocation nucléaire et la fixation sur une séquence d'ADN spécifique (Elément de réponse aux hormones) en amont de

promoteurs de gènes cibles. Cette fixation régule l'expression de ces gènes. **Ainsi l'objectif de ce chapitre est d'étudier l'effet d'une dose environnementale d'EE₂ sur l'expression des gènes codant des cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I, à partir de culture d'explants de placodes olfactives.** Afin de pouvoir détecter et isoler les cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I, nous avons réalisé des cultures de placodes olfactives de souris transgéniques GFAP-GFP (présentation de la lignée dans l'introduction du Chapitre 1).

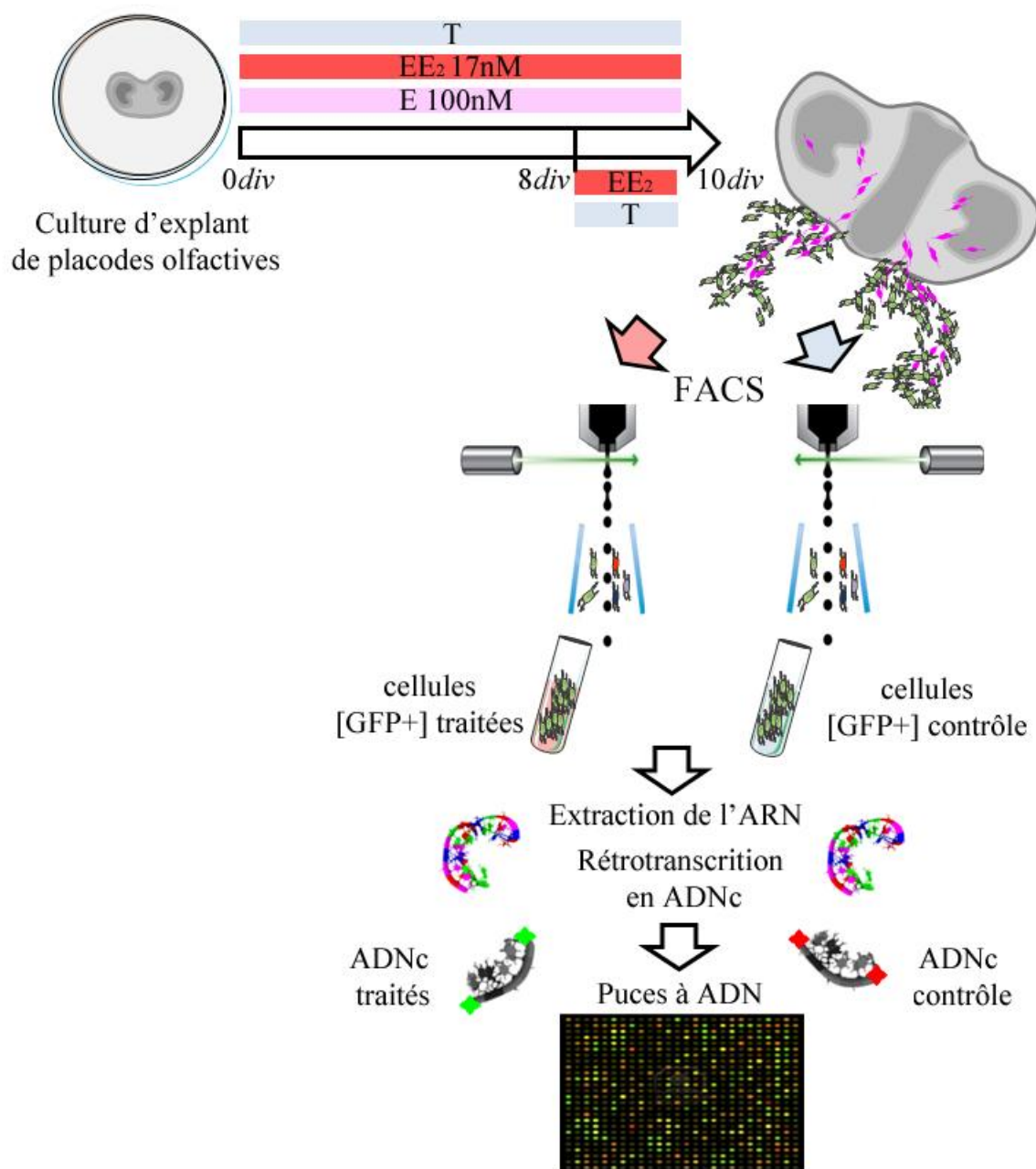


Figure 13 : Schéma général des études menées dans le chapitre 3

II. Matériel et Méthode

Les dissections des placodes olfactives à partir de souris transgéniques FVB/N-Tg(GFAP-GFP), le génotypage des embryons, le maintien en cultures de ces placodes, le tri par FACS des cellules [GFP+] et l'extraction de l'ARN, sont décrits dans le chapitre I.

II.1. Cultures de placodes olfactives GFAP-GFP et traitements au 17- α -éthinyloestradiol

Les explants de placodes olfactives ont été cultivés dans le milieu de culture classique (SFM, cf chapitre 1) en absence d'inhibiteur de la prolifération cellulaire (5' fluoro 2-deoxyuridine) et dans un milieu appauvri en agents oestrogéniques (F12 sans en rouge phénol). Les placodes olfactives transgéniques [GFP+] ont été identifiées par génotypage (cf chapitre 1), et confirmées par épifluorescence après 6 jours de cultures. Plusieurs séries de dissections d'explants de placodes olfactives ont été réalisées pour chaque type de traitement (Tableau 1). Le nombre d'explants de placodes olfactives utilisé par expérience et par traitement est répertorié dans le **Tableau 1**.

Deux protocoles expérimentaux ont été réalisés :

- Pour le premier protocole expérimental, les placodes olfactives [GFP+] des quatre séries de dissections ont été traitées avec 17nM d'EE₂ pendant 48h (Sigma Aldric), entre le 8^{ème} et 10^{ème} jour de culture (**Figure 1**). L'EE₂ a été dissout dans de l'éthanol à une concentration de 1mg/ml, puis dilué dans le milieu de culture SFM à une concentration finale de 5ng/ml (concentration finale d'éthanol de 0,0005%). Pour chaque série de dissection la moitié des cultures [GFP+] étaient cultivées en condition contrôle (T, **Figure 1**), c'est-à-dire dans du SFM avec une concentration finale d'éthanol à 0,0005%.
- Pour le second protocole expérimental les placodes olfactives ont été traitées pendant 10 jours, dès leurs mises en cultures :
 - soit avec 17nM d'EE₂,
 - soit avec 100nM de 17- β -œstradiol (E₂),
 - soit en condition témoin (T) (Figure 1).

Traitement	Nb de Femelles gestantes	Nb de PO [GFP+]	nb de cellules [GFP+]	ARN (pg/μl)	R.I.N
EE ₂ (48h) ₁	4	8	59 000	1,00.10 ⁺³	8.3
T(48h) ₁		7	30 800	1,55.10 ⁺³	8.7
EE ₂ (48h) ₂	4	7	47 020	1,00.10 ⁺³	8.7
T(48h) ₂		7	47 000	8,17.10 ⁺²	8.1
EE ₂ (48h) ₃	3	7	38 140	1,66.10 ⁺³	8.7
T(48h) ₃		6	32 200	9,29.10 ⁺²	9.1
EE ₂ (48h) ₄	3	8	25 940	4,09.10 ⁺³	8.9
T(48h) ₄		6	28 670	1,82.10 ⁺³	9.1
EE ₂ (10j) ₁	4	26	252 350	1,24.10 ⁺⁴	9,6
EE ₂ (10j) ₂	5	23	184 000	1,70.10 ⁺⁴	9,5
T(10j) ₁	4	26	80 290	2,71.10 ⁺⁴	9,9
T(10j) ₂	4	30	58 510	2,50.10 ⁺⁴	9,2
E ₂ (10j) ₁	4	20	203 300	5,76.10 ⁺³	8,9
E ₂ (10j) ₂	2	6	52 480	1,85.10 ⁺⁴	8,3

Tableau 3 Quantité et qualité du matériel biologique utilisé pour étudié l'effet du 17-α éthinylestradiol sur le transcriptome des cellules gliales olfactives [GFP+]. Les cultures d'explants de placodes olfactives ont été traitées avec 17nM de 17-α éthinylestradiol pendant 48h, EE₂(48h) et pendant 10 jours EE₂(10j), mais aussi avec 100nM d'œstradiol pendant 10 jours E₂(10jours). T(48h) et T(10j) désignent les conditions témoins. (R.I.N) : RNA Integrity Number. Les chiffres (1-4) en indice désignent les numéros de série de dissections

Protéine	Gène cible (num d'accession)	sens	Séquence (5'-3')	Tm (°C)	Taille du produit
ERα	Esr1 (NM_007956.4)	S	AATGAAATGGGTGCTTCAGG	54	302pb
		AS	AGGTGGACCTGATCATGGAG		
ERβ	Esr2 (NM_010157.3) (NM_207707.1)	S	AGAGTAGCCGGAAGCTGA	56	218pb
		AS	CTCCAGCAGCAGGTCGTA		
GPR30	Gpr30 (NM_029771.3)	S	AAGCCAGGGTGTCAATTTCTG	54	827pb
		AS	CGCTAGGTACCTGTCTGAAGC		

Tableau 4 : Séquences des amorces de RT-PCR des gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes

L'E₂ a été dissout à 13,6mg/ml dans de l'éthanol puis dilué dans le milieu de culture SFM à une concentration finale de 27,2ng/ml (concentration finale d'éthanol de 0,0002%).

Pour les deux protocoles expérimentaux, les placodes olfactives [GFP+] ont été regroupées après 10 jours de culture, et les cellules [GFP+] ont été triées et isolées par FACS (cf Article 1, Figure 1).

II.2. Analyse par RT-PCR de l'expression des gènes codants pour les récepteurs aux œstrogènes en condition contrôle

Les RT-PCR ont été réalisées à partir d'ARN extrait de cellules [GFP+] isolées par FACS à partir de cultures de placodes olfactives GFAP-GFP âgées de 10 jours (cf **Article 1**). Trois gènes d'intérêts ont été ciblés :

- le gène *Esr1* (Estrogen receptor 1) qui code pour ER α ,
- le gène *Esr2* (Estrogen receptor 2) qui code pour ER β
- le gène *Gpr30* qui code pour le récepteur membranaire aux œstrogènes.

Les séquences des amorces et les conditions de RT-PCR utilisées sont répertoriées dans le tableau 2. La *Gapdh* a été ciblée comme gène de référence (les séquences et conditions de RT-PCR sont répertoriées dans **article 1**).

II.3. Procédure de puces à ADN

II. 3. a. Extraction et analyse de l'ARN

L'extraction de l'ARN total a été faite au Tryzol® (cf **article 1**). La concentration d'ARN (en pg/ μ L) a été déterminée par spectrophotométrie Nanodrop® ND-1000 spectrophotomètre (Nyxor Biotech, Paris, France). La qualité et l'intégrité de l'ARN (R.I.N : RNA Integrity Number) ont été analysées par Bioanalyseur 2100 à l'aide de RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies). Les valeurs sont listées dans le tableau 1.

Pour réaliser les puces à ADN une quantité minimale de 50ng est nécessaire et une bonne qualité de l'ARN est essentielle. Le RIN, "RNA Integrity Number", permet d'estimer l'intégrité de l'ARN total des échantillons. Le principe de cette technique de « laboratoire sur puce » est de faire migrer sur gel des molécules d'ARN liées à un marqueur fluorescent.

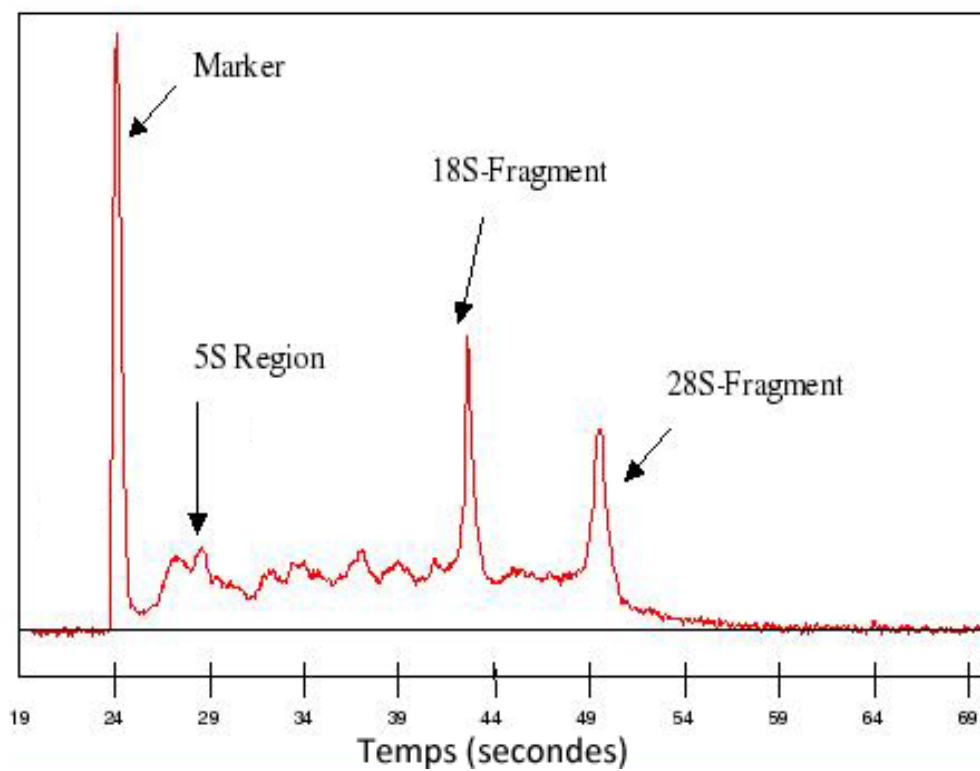


Figure 14 : Segments d'un électrophérogramme (Scroeder 2006)

L'appareil mesure en temps réel l'intensité de la fluorescence émise en fonction du temps de rétention de l'échantillon. Ces données sont validées par rapport à un marqueur de poids moléculaire (Marker, **Figure 2**) et permet d'estimer la pureté de l'échantillon et une éventuelle dégradation des acides nucléiques en mesurant :

- Le rapport de la superficie du pic du 18S et 28S sur l'aire totale de la courbe qui reflète la proportion de grosses molécules (18S et 28S) par rapport aux plus petites (détectées entre le pic du 5S et le pic du 18S, **Figure 2**).
- La hauteur du pic 28S par rapport à celui du 18S. Le pic du 28S disparaît plus vite que le pic du 18S lorsque l'ARN est en cours de dégradation.

Les valeurs du RIN sont comprises entre 10 (pour l'ARN intact) et 1 (pour l'ARN très dégradé). Les analyses de puces à ADN sont réalisées à partir d'ARN présentant un $RIN \geq 6,5$.

II.1. Conception des puces à ADN

La conception et l'analyse des puces à ADN ont été réalisées par la Plateforme Puces à ADN U915-IFR26 à Nantes.

II. 1. a. Le principe de la technique de puces à ADN

Le principe de cette technique est de marquer des ADNc provenant de conditions différentes avec deux fluorochromes différents : un rouge pour la première condition (par exemple les cultures témoins) et un vert pour la deuxième condition (par exemple les cultures traitées à l'EE₂). Les ADNc provenant des deux échantillons sont placés sur une matrice d'ADN simple brin (la sonde). Les ADNc fluorescents vont ainsi s'hybrider sur les sondes. Après excitation par un laser, la fluorescence émise par les ADNc hybridés est récupérée via un photomultiplicateur couplé à un microscope confocal. On obtient alors deux images dont le niveau de gris représente l'intensité de la fluorescence lue. Si on remplace les niveaux de gris par des fausses couleurs (rouge pour la première condition et vert pour la seconde) on obtient en superposant les images des spots allant du rouge (ADNc de la première condition fixée) au vert (ADNc de la seconde condition fixée) en passant par le jaune (ADNc des deux conditions fixées en quantité égale). Pour déterminer le niveau d'expression différentiel des gènes entre nos conditions, nous supposons que la quantité d'ADNc fluorescent fixée est proportionnelle à la quantité d'ARNm du départ. Si le ratio de la fluorescence rouge / la fluorescence verte est

supérieur à 1 (rouge sur l'image), le gène est sur-exprimé dans la condition contrôle ; si ce ratio est inférieur à 1 (vert sur l'image), le gène est sur-exprimé dans la seconde condition.

II. 1. b. La conception des puces à ADN

L'ARN a été amplifié et l'ADN complémentaire (ADNc) de chaque échantillon a été préparé selon le protocole du fabricant (Pseudo-MonoCouleur) et hybridé sur le génome de souris entier 4x44K Microarray (Agilent Technologies). Deux échantillons ont été hybridés sur chaque puce 4x44K, un échantillon marqué avec la cyanine 3 et un échantillon marqué avec la cyanine 5. Afin de valider les puces à ADN, des échantillons ont été étiquetés alternativement par cyanine 3 ou 5. Après hybridation, les puces à ADN ont été lavées et numérisées à l'aide d'Agilent Scanner. Les résultats ont été extraits en utilisant la fonction 9.5.1 logiciel d'extraction (Agilent Technologies).

II.2. Analyse des puces à ADN

II. 2. a. Principes des analyses des résultats de puces à ADN

1. L'analyse globale de « Clustering » hiérarchique

Le « clustering hiérarchique » permet de visualiser l'ensemble des données représentées en « matrice de sondes différentiellement exprimées » (**Figure 6B**). Cette matrice est représentée par les sondes en ligne et les échantillons en colonne (**Figure 6B**). Elle permet de visualiser les gènes induits (en rouge) et les gènes réprimés (en vert) pour chaque échantillon (**Figure 6B**). Les échantillons sont classés selon leur profil d'expression sur l'ensemble de la puce. Ce classement, représenté sous forme d'arbre ou dendrogramme (**Figure 6A**) permet de vérifier le regroupement des conditions expérimentales entre-elles et d'identifier des conditions ayant un profil similaire. L'analyse par « clustering » est une méthode de classification non supervisée et automatique. Il s'agit pour un logiciel de diviser un groupe hétérogène de données, en sous-groupes de manière à ce que les données considérées comme les plus similaires soient associées au sein d'un groupe homogène (ou clusters) et qu'au contraire les données considérées comme différentes se retrouvent dans d'autres groupes distincts. L'objectif est de permettre une extraction de connaissance organisée à partir de ces données.

2. Extraction et annotations des « clusters »

Pour chaque sonde un test statistique (test de student) est effectué par question binaire posée : La sonde est-elle différentiellement exprimée dans notre condition témoin par rapport

à notre condition traitement à l'EE₂? Une p-value est attribuée à chaque sonde et sera ordonnée selon le « clustering » et rapportée sur un graphique selon la formule $-\log_{10}(p\text{-value})$ (points violets, **Figure 6C**). Une moyenne mobile est calculée (en orange, **Figure 6C**) afin de lisser la courbe. Ce type de représentation graphique nous permet d'observer des pics ou « des signatures de gènes » (encadrés, **Figure 6C**) qui distinguent les groupes de gènes ou cluster répondant à la question du test. Ainsi, un cluster correspond à un groupe de gènes dont l'expression varie dans le même sens et pouvant être associé à une ou plusieurs fonctions différentes.

Des annotations de voies de signalisations biochimiques (ou pathway) et des annotations fonctionnelles peuvent être associées aux clusters, en utilisant la base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) et GO (GeneOntology). « KEGG pathway » permet d'identifier les voies biochimiques qui pourraient être perturbées dans le contexte biologique étudié, en analysant les réseaux d'interactions moléculaires à partir de données bibliographiques. « GeneOntology » est le regroupement de plusieurs banques de données génomiques visant à construire une ontologie générique, c'est-à-dire un vocabulaire contrôlé et structuré applicable à toute espèce. Le GO décrit : les fonctions moléculaires (tâches réalisées par les produits de gènes), les processus biologiques (processus dans lesquels les gènes sont impliqués) et les composants cellulaires (où ces gènes agissent).

La pertinence des regroupements des gènes par voie de signalisation biochimique et par fonction (annotation KEGG et annotation GO) dans un cluster est évaluée grâce à plusieurs critères : la significativité (p-value) et l'enrichissement.

- **La significativité ou p-value** est calculée pour chaque annotation, par un test de Fisher, en fonction du nombre de gènes du cluster associé à cette annotation et du nombre de gènes de la matrice associé à cette annotation. Ainsi la p-value permet de déterminer des listes d'annotations significativement enrichies.
- **L'enrichissement** de chaque annotation est calculé par un rapport de fréquences du nombre total de gènes du cluster n'ayant pas d'association avec cette annotation et du nombre total de gènes de la matrice n'ayant pas d'association avec cette annotation. Ainsi l'enrichissement permet de mettre en évidence les annotations qui sont sur-représentées dans la liste de gènes.

Les annotations les plus spécifiques du cluster sont celles qui auront la p-value la plus petites (p-value <0,05) et l'enrichissement le plus grande (Enr >1,6).

3. L'analyse différentielle par gène et annotation fonctionnelles des gènes

Le principe est de rechercher des gènes différentiellement exprimés entre deux conditions. Une comparaison de la moyenne d'expression de chaque sonde est réalisée entre les deux conditions par un test de student. Une analyse de significativité des puces est réalisé à partir de la p-value ($<0,05$) et de l'estimation du taux d'erreur. Une annotation fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés a été réalisée en utilisant la base de données GO.

II. 2. b. Méthodes des analyses des résultats de puces à ADN

Les différentes étapes d'analyses des puces à ADN sont listées dans l'organigramme en **Figure 3**. Les données d'expression brutes ont été normalisées selon la méthode de LOWESS (normalisation non linéaire). Les sondes de faible intensité ont été éliminées après filtrage des données. Le filtrage utilisé admet qu'environ la moitié des gènes ne sont pas exprimé dans le système étudié. Les sondes conservées sont celles qui dépassent le seuil dans au moins 50% des échantillons d'une condition expérimentale. Ainsi 28574 sur 43379 sondes ont été conservées pour les échantillons traités pendant 10 jours et 23242 sur 43379 sondes ont été conservées pour les échantillons traités pendant 48h.

Les profils d'expressions géniques ont été utilisés afin de classer les gènes. Les échantillons biologiques ont été classés par un procédé d'analyse hiérarchique en utilisant un logiciel de « clustering ». Les résultats de l'analyse de classification hiérarchique ont été visualisés en utilisant le Programme TreeView. Un test t de Student a été appliqué pour déterminer les gènes différentiellement exprimés, avec une signification statistique seuil (p-value) de 0,05. Les annotations des voies biochimiques (Pathway) et les fonctions ont été effectuées à l'aide du logiciel David (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) et GoMiner (<http://discover.nci.nih.gov/>). Une annotation est considérée comme statistiquement régulée lorsqu'elle présente un enrichissement de 1.6 et une p-value de 0.05. L'ontologie et la définition de chaque annotation KEGG et de chaque annotation GO ont été respectivement obtenues sur <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> et sur <http://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>.

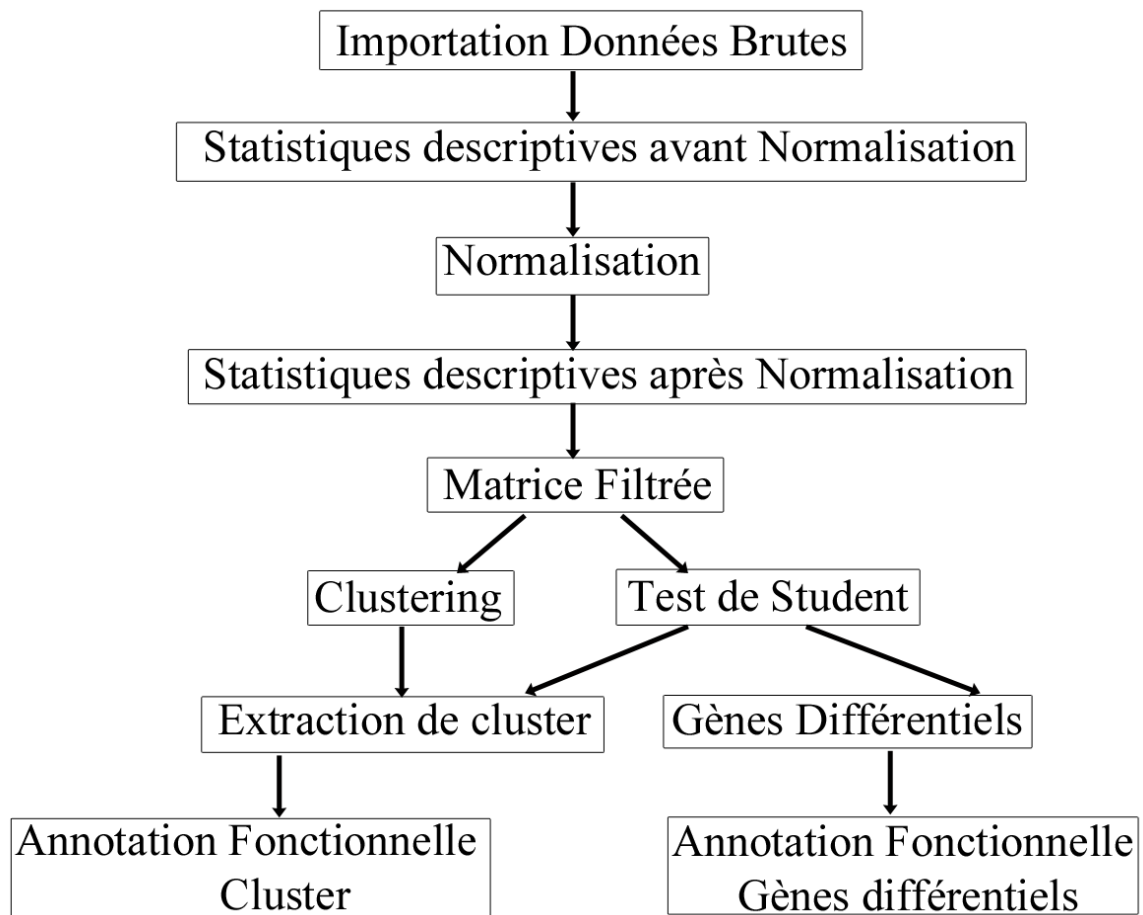


Figure 15 : Etapes d'analyses primaires des puces à ADN

III. Résultats

III.1. Les cellules gliales olfactives [GFP+] expriment les gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes

Dans un premier temps nous avons vérifié si les cellules gliales olfactives [GFP+], isolées par FACS à partir de cultures de PO, exprimaient les gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes. Nous observons que les cellules [GFP+] expriment fortement le gène qui code pour le récepteur membranaire aux œstrogènes, le GPR30 (ADNc dilué au 1/10, Figure 4). Ces cellules gliales expriment également les gènes codant ER β (*Esr2*) et ER α (*Esr1*) (ADNc dilué au 1/1, **Figure 16**).

Les cellules gliales olfactives GFAP-GFP associées aux neurones à GnRH-I expriment les trois récepteurs aux œstrogènes dont les récepteurs nucléaires ER α et ER β . Ainsi les cellules gliales olfactives peuvent être une cible des dérivés oestrogénomimétiques.

III.2. Effet d'un traitement de 17- α -éthinyloestradiol sur la survie cellulaire des explants et sur le pourcentage de cellules gliales [GFP+] : Analyse par FACS

Afin d'évaluer l'effet d'un traitement aigu et chronique de 17nM d'EE₂ (48h et 10 jours) sur le transcriptome des cellules gliales associées aux neurones à GnRH-I, nous avons dans un premier temps isoler les cellules gliales [GFP+] des explants par FACS.

Le FACS nous permet de mesurer et d'évaluer des paramètres cellulaires. En effet la lumière diffractée mesurée en face du rayon laser (paramètre FS Lin, **Figure 17A**) permet d'évaluer la taille des cellules. La lumière diffractée, mesurée à 90° (paramètre SS log, **Figure 17A**) donne une mesure de la granulosité de la cellule. Ces paramètres permettent de distinguer les débris cellulaires, des cellules vivantes (**Figure 17A**) et ainsi de déterminer le pourcentage de survie cellulaire ou de viabilité. Parmi les cellules vivantes nos cellules d'intérêt sont détectées grâce à la fluorescence émise par le GFP endogène après excitation (**Figure 17B**), avant d'être isolées. Ainsi on peut évaluer le pourcentage de cellules [GFP+], parmi les cellules vivantes, selon nos conditions de cultures.

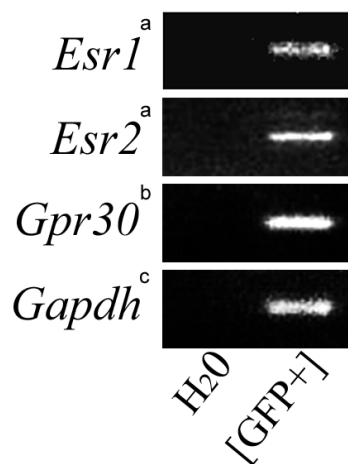


Figure 16 Expression des gènes codant pour les récepteurs aux œstrogènes par les cellules gliales olfactives GFAP-GFP. RT-PCR qui illustre l'expression d'*Esr1* (ER α), d'*Esr2* (ER β) et *Gpr30* par les cellules [GFP+] isolées par FACS, à partir des cultures de placodes olfactives GFAP-GFP (PO). (n=3, groupement de ~20 PO pour les 3 FACS). L'ADNc a été utilisé à différentes dilutions : (a) 1/1, (b) 1/10, (c) 1/50.

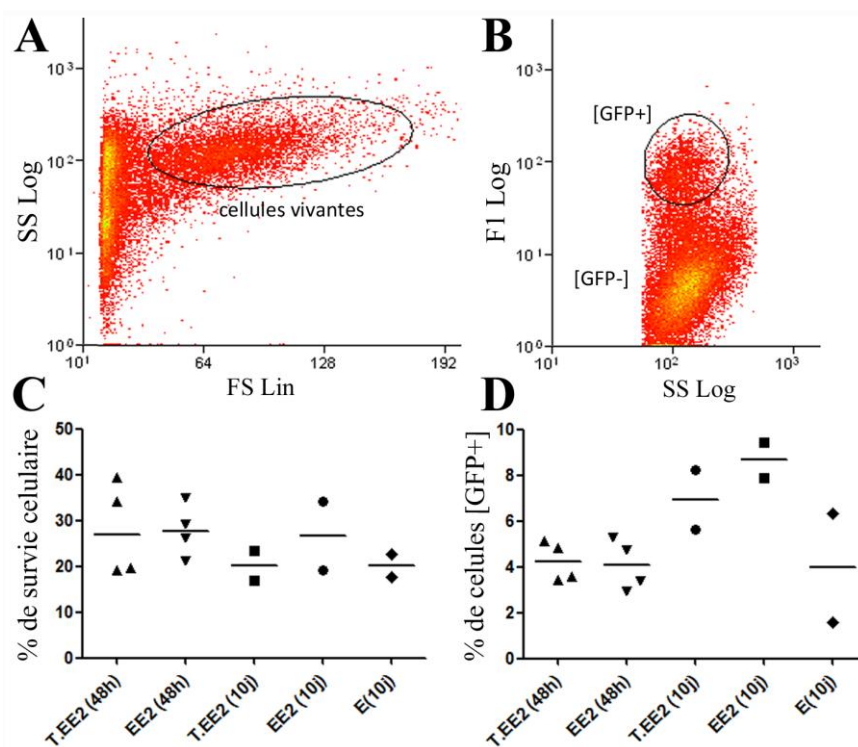


Figure 17 : Analyses des cultures d'explants de placodes olfactives par FACS. (A-B) Diagrammes de dispersion (Dot Plot) qui représentent l'isolation de cellules vivantes des débris cellulaires (A) et l'isolation des cellules [GFP+] des cellules [GFP-] (B). (C-D) Graphiques qui représentent le pourcentage de survie cellulaire des cultures d'explants de placodes olfactives (PO) (C) et le pourcentage de cellules [GFP+] isolées à partir de ces cultures (D). Chaque échantillon est représenté par un point et la moyenne des échantillons est représentée par un trait. Les cultures ont soit été traitées à l'EE₂ pendant 48h EE₂(48h) ou pendant 10jours EE₂(10j) ; soit traitées à l'œstradiol pendant 10 jours E₂(10j). T(48h) et T(10j) représentent les témoins respectifs

Nous avons donc analysé l'effet d'un traitement de 48h d'EE₂ sur la survie cellulaire globale des cultures d'explants de placodes olfactives (**Figure 17C**) et sur le pourcentage de cellules [GFP+] (**Figure 17D**). Nous n'observons pas d'effet significatif du traitement sur la survie cellulaire des placodes olfactives ; avec une médiane (25% Percentile-75% Percentile) de 26,89 (19,26-38,12) pour les lots témoins et de 27,68 (22,43-33,44) pour les lots traités (test de Mann-Whitney). De même, nous n'observons pas d'effet de ce traitement sur le pourcentage de cellules [GFP+] détectées (4,2 (3,4-5) pour le lot EE₂ versus 4 (3-5,3) pour le lot témoin.

A titre indicatif nous avons également représenté sur les graphiques de nuages de points les résultats obtenus pour les cellules traitées pendant 10 jours à l'EE₂ et l'E₂ (**Figure 17C, D**). En effet, le faible nombre d'échantillons (N=2) ne nous permet pas de comparer statistiquement les effets des traitements sur les deux paramètres cités. Cependant, on observe en moyenne un pourcentage de survie cellulaire compris entre 20% et 30%, quelles que soient les conditions de cultures (**Figure 17C**). En ce qui concerne le pourcentage de cellules [GFP+] détectées, on observe une grande variabilité entre les témoins des cellules traitées pendant 48h (4%) et les témoins des cellules traitées pendant 10 jours (8%) (**Figure 17D**). Nous pouvons l'expliquer par le fait que les traitements de 10 jours ont été réalisés à partir d'embryons de souris homozygote et hétérozygotes et les traitements de 48h ont été réalisés à partir d'embryons de souris hétérozygotes. Il est donc difficile de conclure sur le faible pourcentage de cellules [GFP+] détecté dans les cultures d'explants traités à l'œstradiol pendant 10 jours par rapport aux pourcentages détectés dans les cultures d'explants traitées à l'EE₂ ou cultivées en milieu témoin.

III.3. Effet d'un traitement de 17- α -éthinyloestradiol (EE₂) sur le transcriptome des cellules gliales [GFP+]

Afin d'évaluer l'effet d'un traitement aigu et chronique de 17nM d'EE₂ (48h et 10 jours) sur le transcriptome des cellules gliales [GFP+] associées aux neurones à GnRH-I, nous avons utilisé une analyse globale de recherche de « Cluster » ainsi qu'une analyse par gènes (analyse différentielle).

III. 3. a. Effet d'un traitement de 48h à l'EE₂ sur le transcriptome des cellules gliales [GFP+]

Nous avons comparé le profil d'expression des cellules gliales [GFP+] isolées à partir de cultures de PO cultivées en condition contrôle (T(48h), N=4) avec le profil des cellules traitées pendant 48h avec 17nM d'EE₂ (EE₂(48h) N=3) (**Figure 18**).

1. Analyse globale de « Clustering » et annotations des « clusters »

La classification des échantillons montre un regroupement des échantillons témoins, et un groupement des 2/3 des échantillons traités à l'EE₂ (**Figure 18A**); l'effet du traitement de l'EE₂ sur le transcriptome des cellules gliales [GFP+] est reproductible. La comparaison du profil d'expression des deux conditions T(48h) *versus* EE₂(48h) met en évidence deux « clusters » différentiellement exprimés : i) un premier cluster dont l'expression des gènes diminue en condition traitée (vert, Cluster 1, **Figure 18**), ii) un second cluster dont l'expression des gènes augmente en condition traitée à l'EE₂ (rouge, Cluster 2, **Figure 18**). La liste de gènes associés à ces clusters est listée en annexe II.

a. Annotations associées au Cluster 1 de gènes réprimés en conditions traitées à l'EE₂

Le cluster 1 est caractérisé par une répression de 272 gènes dont 45,9% de ces gènes codent pour des phosphoprotéines ($p=0,3.10^{-4}$ et $Enr=1,33$). Plusieurs annotations de signalisations biochimiques (**Tableau 5** et d'annotations fonctionnelles (**Tableau 6** associées à ce cluster ont été mises en évidence ($p\text{-value} < 0,05$ et $Enr > 1,6$). La liste des gènes associés à ces annotations et la définition de celles-ci sont listées en annexe I.

Tout d'abord nous nous sommes intéressés aux annotations concernant des processus biologiques « généraux ». Nous mettons en évidence que la voie de signalisation p53 (mmu04115, **Tableau 5**) impliquée dans l'apoptose cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire (Annexe II), est très enrichie. Deux processus biologiques associés à ces phénomènes sont détectés (tableau 4) : l'arrêt du cycle cellulaire (GO:0007050) et la régulation de l'activité des caspases (GO:0007050). Nous remarquons un enrichissement des annotations impliquées dans le catabolisme et le métabolisme des protéines : la protéolyse médiée par l'ubiquitination (mmu04120, tableau 3) et la régulation de la traduction (GO:0006417, **Tableau 5**), mais également dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes (GO:0010608, **Tableau 5**).

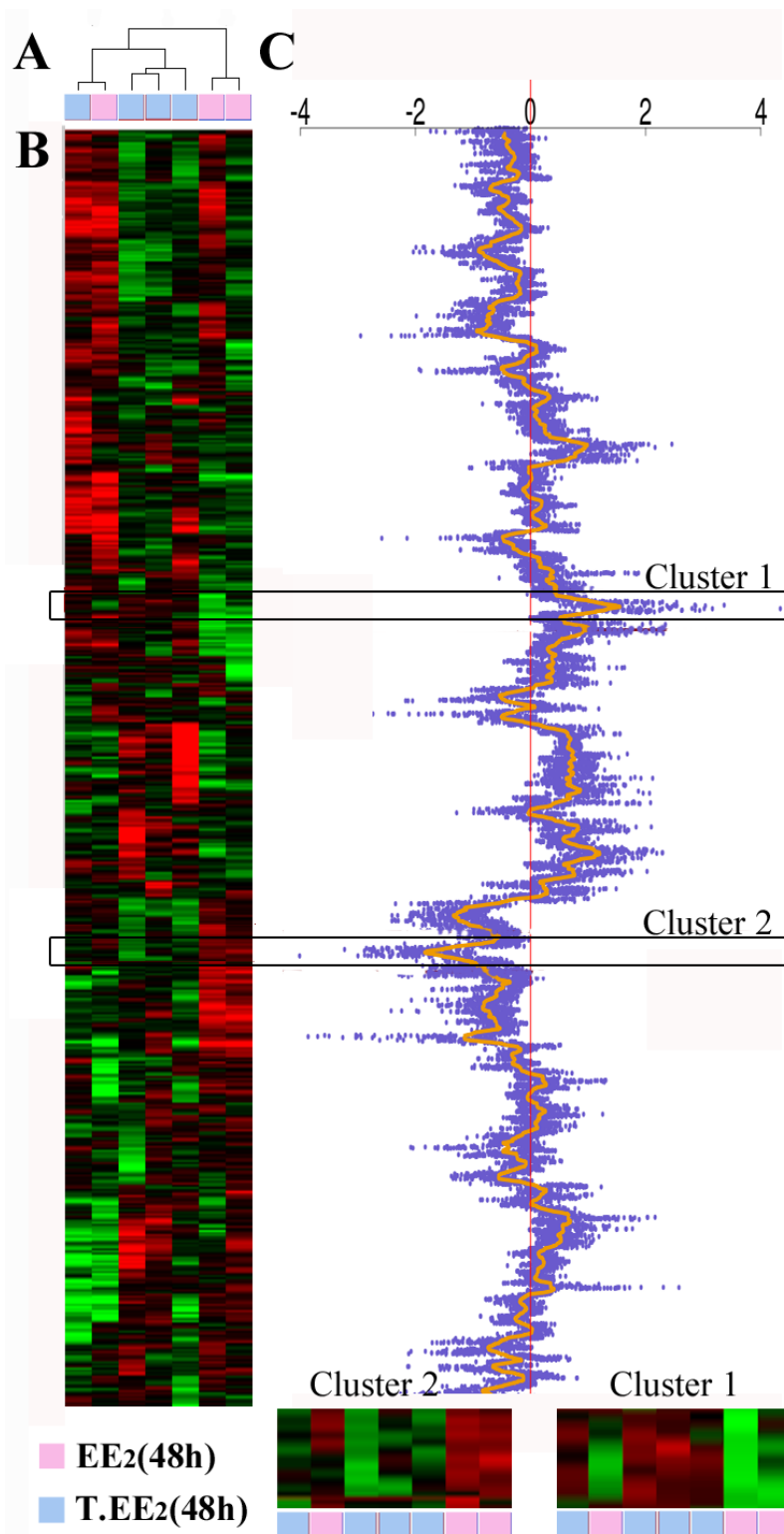


Figure 18 : Matrice de sondes illustrant le différentiel d'expression des échantillons de cellules gliales [GFP+] traitées pendant 48h à l'EE2 par apport aux échantillons témoins. (A) Arbre de classification des échantillons selon leur profil d'expression génique. (B) Matrice de sondes représentées par les sondes en ligne et les échantillons en colonne. En rouge les sondes sur-exprimées et en vert les sondes sous-exprimées. (C) Représentation en nuage de points de $-\log_{10}$ (p-value) de chaque sonde différentiellement exprimée entre les témoins T(48h) et les traitées EE₂(48h). Une moyenne mobile est représentée en orange. Cluster 1 : cluster de gènes sur-exprimés en condition témoin, Cluster 2 : cluster de gènes sur-exprimés en condition traités l'EE₂.

KEGG Catégorie	Annotation	% gènes	p.value	Enr
mmu04115	p53 signaling pathway	2,94	2,99.10 ⁻⁴	6,02
mmu04120	Ubiquitin mediated proteolysis	2,94	1,60.10 ⁻²	2,99
mmu04520	Adherens junction	2,21	1,65.10 ⁻²	3,96
mmu04310	Wnt signaling pathway	2,94	2,70.10 ⁻²	2,70
mmu04510	Focal adhesion	3,31	3,96.10 ⁻²	2,29

Tableau 5 : Tableau des annotations des signalisations biochimiques sous-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 48h à 17nM d'EE₂. Enr : Enrichissement

GO Catégorie	Ontologie	Annotation	% gènes	p.value	Enr
GO:0043281	Processus Biologique	Regulation of caspase activity	3,67	1,00.10 ⁻⁴	4,55
GO:0007050	Processus Biologique	cell cycle arrest	4,78	1,00.10 ⁻⁴	3,68
GO:0006417	Processus Biologique	Regulation of translation	2,21	1,57.10 ⁻²	4,07
GO:0010608	Processus Biologique	Post-transcriptional regulation of gene expression	2,57	2,03.10 ⁻²	3,26
GO:0006984	Processus Biologique	ER-nuclear signaling pathway	1,47	5,93.10 ⁻³	10,63
GO:0035097	Composant cellulaire	Histone methyltransferase complex	2,57	3,00.10 ⁻⁴	5,41
GO:0034708	Composant cellulaire	Methyltransferase complex	2,57	3,00.10 ⁻⁴	5,41
GO:0071339	Composant cellulaire	MLL1 complex	1,84	2,00.10 ⁻⁴	8,59

Tableau 6 : Tableau des annotations fonctionnelles sous-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 48h à 17nM d'EE₂. Enr : Enrichissement

Nous mettons en évidence trois annotations qui désignent les lieux d'action des gènes associés à ce cluster (Composant cellulaire, Tableau 4). Ces trois annotations sont impliquées dans la méthylation des histones : GO:0035097, GO:0034708, GO:0071339 (**Tableau 6**); le complexe MML1 (Mixed Lineage Complex leukemia protein-1) étant un membre de la famille des histones lysine N-méthyltransferase (Annexe II).

En ce qui concerne les annotations plus « spécifiques », nous mettons en évidence que l'annotation fonctionnelle de la voie de signalisation des récepteurs nucléaires aux œstrogènes est très enrichie (GO:0006984, **Tableau 6**). Deux annotations de signalisations en rapport avec le développement sont détectées : i) la voie de signalisation des morphogènes Wnt (mmu04310, **Tableau 5**), impliqués dans la prolifération des progéniteurs cellulaires et le contrôle de la division asymétrique (**annexe I**), ii) l'adhésion focale (mmu04510, **Tableau 5**) qui joue un rôle essentiel dans la motilité, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (**annexe II**). Nous détectons un enrichissement de l'annotation des jonctions d'adhésions intercellulaires (mmu04520), qui implique les CAM (cell adhesion molecule, **annexe I**).

b. Annotations associées au Cluster 2 de gènes induits en conditions traitées à l'EE₂

Le cluster 2 est caractérisé par une induction de 269 gènes dont 49,4% codent pour des phosphoprotéines ($p=0,9.10^{-7}$ et $Enr=1,44$). La liste des gènes associés aux annotations de signalisations biochimiques (**Tableau 7**) et fonctionnelles (**Tableau 8**) ainsi que la définition de ces annotations sont listées en annexe II.

Nous mettons en évidence deux processus biologiques impliqués dans la progression du cycle cellulaire (GO:0022402 et GO:0007049, **Tableau 8**). Nous remarquons un enrichissement des annotations impliquées dans le catabolisme et le métabolisme des protéines :

- la protéolyse médiée par l'ubiquitination (mmu04120, **Tableau 7**), qui implique une activité ligase (GO:0004842, **Tableau 8**) ;
- la dégradation des ARN (mmu03018, **Tableau 7**) ;

GO Catégorie	Ontologie	Annotation	% gènes	p.value	Enr
GO:0004842	Fonction moléculaire	ubiquitin-protein ligase activity	4,09	1,70.10-6	7,56
GO:0022613	Processus Biologique	ribonucleoprotein complex biogenesis	2,97	3,51.10-3	4,06
GO:0042254	Processus Biologique	ribosome biogenesis	2,60	5,23.10-3	4,37
GO:0007017	Processus Biologique	microtubule-based process	2,97	3,75.10-2	2,55
GO:0022402	Processus Biologique	cell cycle process	5,58	2,23.10-3	2,55
GO:0007049	Processus Biologique	cell cycle	7,06	4,26.10-3	2,08

Tableau 7 : Tableau des annotations fonctionnelles sur-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 48h à 17nM d'EE₂. **Enr : Enrichissement**

KEGG Catégorie	Annotation	% gènes	p.value	Enr
mmu04120	Ubiquitin mediated proteolysis	4,08	3,8E0-5	5,2
mmu03010	Ribosome	2,6	1,00.10-3	5,4
mmu03018	RNA degradation	1,48	5,00.10-2	4,4

Tableau 8 : Tableau des annotations des signalisations biochimiques sur-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 48h à 17nM d'EE₂. **Enr : Enrichissement**

- les processus cellulaires qui permettent la biosynthèse des macromolécules à partir de complexes ribosomiaux (mmu03010, **Tableau 7** et GO:0022613, GO:0022613, GO:0042254, **Tableau 8**).

Nous détectons également un processus biologique, significativement enrichie, impliqué dans les phénomènes cellulaires qui dépendent ou qui modifient le cytosquelette microtubulaire (GO:0007017, **Tableau 8**).

2. L'analyse différentielle par gène et annotation fonctionnelles des gènes

Nous n'avons pas mis en évidence de gènes différentiellement exprimés entre nos deux conditions ($p < 0,05$).

III. 3. b. Effet d'un traitement de 10 jours à l'œstradiol et à l'EE₂ sur le transcriptome des cellules gliales [GFP+]

Nous avons comparé le profil d'expression des cellules gliales [GFP+] isolées à partir de cultures de PO cultivées en condition témoin (T(10j), N=2) avec le profil des cellules traitées pendant 10 jours avec 17nM d'EE₂ (EE₂(10j) N=2). Comme témoin positif nous avons comparé le profil d'expression des cellules [GFP+] isolées à partir de cultures de PO cultivées en condition témoin (T(10j), N=2) avec le profil de cellules cultivées avec 100nM de β -œstradiol ((E₂(10j), N=2) (**Figure 19**).

1. Analyse globale de « Clustering » et annotations des « clusters »

La classification des échantillons sur l'ensemble de la matrice montre un regroupement des échantillons témoins entre eux et des échantillons traités à l'EE₂ (10j) entre eux (**Figure 7A**). Cette classification permet de mettre en évidence un profil similaire de l'expression des gènes entre les cellules traitées avec de l'EE₂ et les cellules traitées à l'E (**Figure 7A**). En effet on observe des signatures de gènes similaires entre les cellules [GFP+] traitées à l'E₂ (**Figure 19B**) et à l'EE₂, (**Figure 19C**). Cependant seules les cellules traitées à l'E présentent deux clusters d'expressions différentiellement exprimés (**Figure 19A, 19D**) : un cluster de gènes réprimés (Cluster 1) et un cluster de gènes induits (Cluster 2) (**Figure 19D**). La définition de chaque annotation associée à ces deux clusters est listée en **annexe II**.

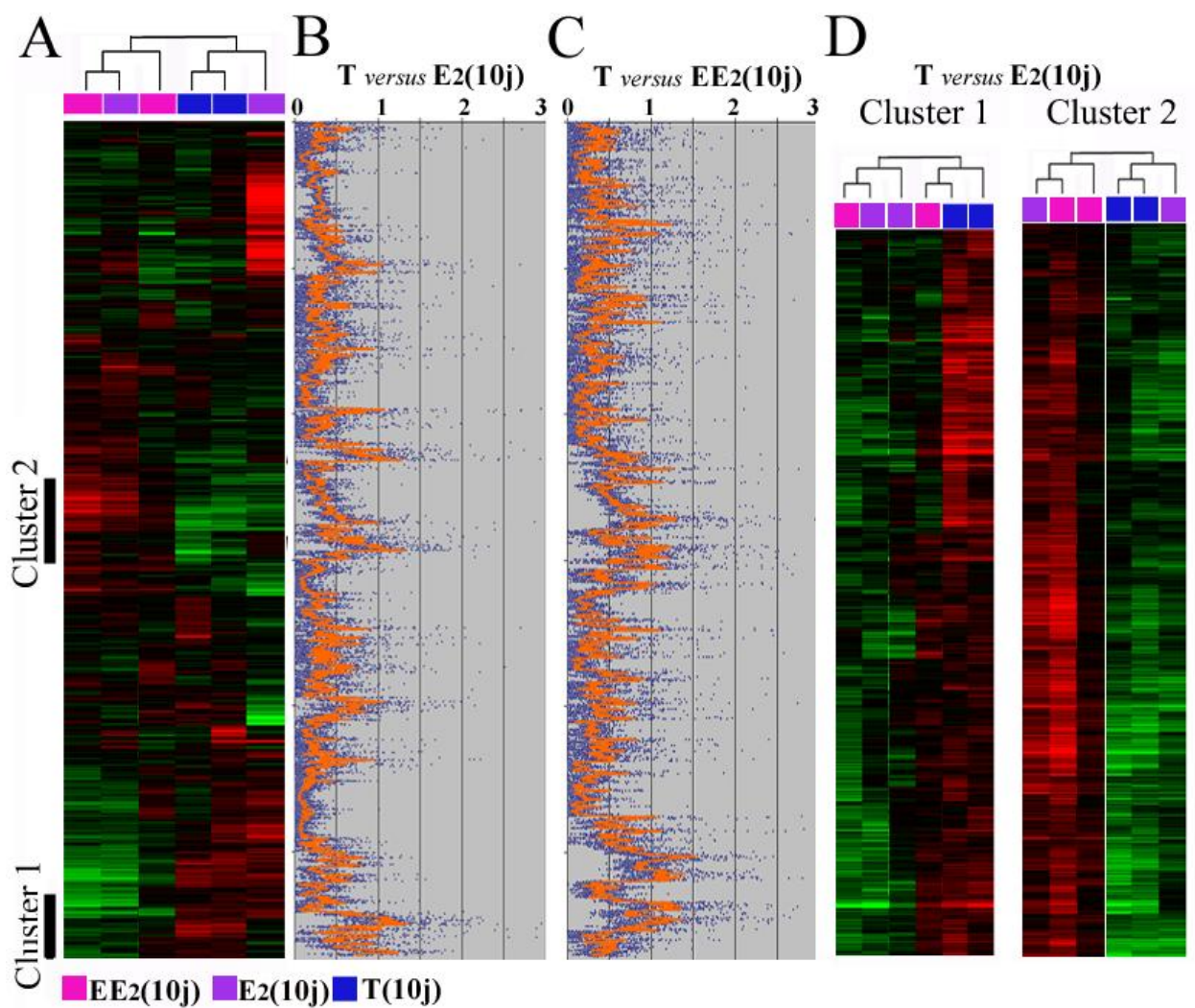


Figure 19 : Matrice de sondes illustrant le différentiel d'expression des échantillons de cellules gliales [GFP+] traitées pendant 10 jours à l'EE₂ et à l'E₂ par apport aux échantillons témoins A) Arbre de classification des échantillons selon leur profil d'expression génique sur l'ensemble de la matrice de sondes représenté par les sondes en ligne et les échantillons en colonne. En rouge les sondes sur-exprimées et en vert les sondes sous-exprimées. (B-C) Représentation en nuage de points de $-\log_{10}$ (p-value) de chaque sonde différentiellement exprimée entre les témoins (T) et les traitées E₂(10j) (B) et entre les témoins (T) et les traitées EE₂(10j) (C). Une moyenne mobile est représentée en orange. (D) Extraction des clusters différentiellement exprimés entre les témoins (T) et les traitées E₂(10j) : (Cluster 1) cluster de gènes sur-exprimés en condition témoin à gauche de l'image, (Cluster 2) cluster de gènes sur-exprimés en condition traitées l'EE₂ à droite de l'image.

a. Annotations associées au Cluster 1 de gènes réprimés en conditions traitées à 100nM l'œstradiol

L'annotation fonctionnelle du cluster 1 de gènes réprimés permet de mettre en évidence un enrichissement des processus biologiques impliqués dans :

- La prolifération cellulaire, plus particulièrement dans le cycle cellulaire mitotique (GO:0000278) et dans l'organisation des chromosomes (GO:0051276) (**Tableau 9**) ;
- Le métabolisme et le catabolisme cellulaires : GO:0006397, GO:0019941, GO:0019941 GO:0044085, GO:0051603 (**Tableau 9**) ;
- L'organisation des microtubules du cytosquelette GO:0070507, GO:0031109, GO:0032886 (**Tableau 9**).

a. Annotations associées au Cluster 2 de gènes induits en conditions traitées à 100nM l'oestradiol

L'annotation fonctionnelle du cluster 2 de gènes induits permet de mettre en évidence un enrichissement des processus biologiques impliqués dans le métabolisme cellulaire permettant la formation de protéine (Go:0042254, Go:0042254, Go:0042254, **Tableau 10**) mais également dans l'activation de ces molécules (Go:0043038, Go:0043038, Go:0043038, **Tableau 10**). Nous détectons également un processus biologique, significativement enrichi, qui est impliqué dans le traitement des ARN non codant (Go:0034470, **Tableau 10**).

2. L'analyse différentielle par gène et annotation fonctionnelles des gènes

Nous n'avons pas mis en évidence de gènes différentiellement exprimés entre nos conditions contrôles et nos conditions traitées soit à l'EE₂, soit à l'E₂ (p<0,05).

GO Catégorie	Ontologie	Annotation	gènes	p.value	Enr
GO:0000278	Processus Biologique	Mitotic cell cycle	35	8,76.10-5	2
GO:0051276	Processus Biologique	Chromosome organization	43	8,16.10-5	1,8
GO:0006397	Processus Biologique	mRNA processing	34	1,79.10-4	1,9
GO:0019941	Processus Biologique	Modification dependent protein catabolic process	56	1,56.10-4	1,6
GO:0019941	Processus Biologique	Cellular macromolecular complex assembly	29	9,09.10-5	2,1
GO:0044085	Processus Biologique	Cellular component biogenesis	57	7,89.10-5	1,7
GO:0051603	Processus Biologique	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process	57	1,67.10-4	1,6
GO:0070507	Processus Biologique	Regulation of microtubule cytoskeleton organization	8	8,08.10-5	5
GO:0031109	Processus Biologique	Microtubule polymerization or depolymerization	8	3,24.10-5	5,6
GO:0032886	Processus Biologique	Regulation of microtubule-based process	10	4,67.10-5	34,4

Tableau 9 : Tableau des annotations fonctionnelles sous-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 10jours à 100nM d'E₂.

GO Catégorie	Ontologie	Annotation	gènes	p.value	Enr
Go:0034470	Processus Biologique	Non coding RNA processing	28	8,77.10-4	1,8
Go:0042254	Processus Biologique	Ribosome biogenesis	22	1,42.10-3	2
Go:0042254	Processus Biologique	Cellular amino acid and derivative metabolic process	48	2,15.10-4	1,7
Go:0042254	Processus Biologique	Translation	83	2,64.10-16	2,51
Go:0043038	Processus Biologique	Amino acid activation	17	2,27.10-6	3,4
Go:0043038	Processus Biologique	Protein folding	26	3,22.10-4	2
Go:0043038	Fonction moléculaire	Structural molecule activity	56	1,48.10-5	1,8

Tableau 10 : Tableau des annotations fonctionnelles sur-exprimées dans les cellules [GFP+] traitées pendant 10jours à 100nM d'E₂.

IV. Discussion du chapitre III

Nous avons émis l'hypothèse que l'impact de l'EE₂ sur le développement et l'activité des neurones à GnRH-I pourraient être médiés par les cellules gliales olfactives. Dans un premier temps, nous avons montré que les cellules gliales olfactives GFAP-GFP isolées par FACS expriment des gènes codant pour les récepteurs nucléaires à l'œstradiol, ER α et ER β . L'étude de l'effet d'un traitement aigu d'EE₂ de 48h et d'un traitement chronique d'EE₂ de 10 jours, sur le transcriptome des cellules gliales olfactives [GFP+] ne permet pas de mettre en évidence de gènes différentiellement exprimés entre nos conditions traitées à l'EE₂ et nos conditions témoins. Une analyse par clustering hiérarchique nous a permis d'extraire des groupes de gènes dont l'expression varie dans le même sens lorsque l'on compare le transcriptome des cellules gliales traitées pendant 48h à l'EE₂ avec celui des cellules cultivées en condition témoin. Un traitement de 10 jours à l'EE₂ n'affectant pas le transcriptome des cellules gliales, nous avons étudié l'effet d'un traitement de 10 jours de 100nM de 17- β -œstradiol sur le transcriptome de ces cellules gliales.

IV.1. Les cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I sont une potentielle cible des œstrogènes et des xéno-œstrogènes

In vitro, l'EE₂ est plus puissant que l'œstradiol pour activer les récepteurs aux œstrogènes dans différents modèles cellulaires de mammifères et de poissons (Cosnefroy et al. 2009; Legler et al. 2002). *In vivo* chez les poissons zèbres une étude a montré que l'effet de l'EE₂ sur l'ontogénèse des neurones à GnRH-III est médié par les récepteurs aux œstrogènes ER α ou ER β . En effet, l'effet de ce PE sur l'ontogénèse des neurones à GnRH-I est aboli en présence d'un antagoniste des récepteurs nucléaires aux œstradiols (Vosges et al 2011). Partant de l'hypothèse que les effets de l'EE₂ sur les neurones à GnRH-I seraient médiés en partie par les cellules gliales, nous avons dans un premier temps étudié si les cellules olfactives engainantes expriment les récepteurs aux œstrogènes. En effet, l'expression des récepteurs aux œstrogènes par les cellules gliales du SNC est bien documentée (pour revue Jung-Teszas 1998), cependant très peu de données existent quant à l'expression des récepteurs aux œstrogènes par les cellules gliales olfactives engainantes. Une étude menée par Gudino-Cabrera met en évidence que les OEC du bulbe olfactif (BO) sont immunoréactives à l'ER β (Gudino-Cabrera 1999). Dans cette revue, les auteurs citent également des données publiées dans un journal espagnol qui montreraient que ces OEC du BO, seraient également

immunoréactives à l'ER α . Cependant une étude de cartographie des récepteurs à l'œstradiol ne montre pas de cellules ER α immunopositives dans la couche glomérulaire du bulbe olfactif (Mitra et al 2003). Seules des cellules ER β immunoréactives sont détectées dans cette couche du BO (Mitra et al 2003) qui est colonisée par les OEC (Marin-Padilla et al 1989). L'expression des gènes codant les ER β par les cellules peuplant cette couche a également été confirmée par hybridation *in situ* (Shima et al 2003). Jusqu'alors, les résultats étaient donc contradictoires et ne concernaient pas les OEC engainants les axones olfactifs et voméronasaux du septum nasal. Dans notre étude nous montrons que les cellules gliales olfactives engainantes associées aux neurones à GnRH-I dans les cultures d'explants de placodes olfactives expriment les gènes codant pour les récepteurs nucléaires aux œstrogènes, ER α et ER β , mais également le récepteur membranaire, GPR30. Dans la littérature, à notre connaissance, aucune donnée n'a été publiée quant à l'expression et/ou la production du récepteur membranaire GPR30 par les OEC.

IV.2. Impact d'un traitement d'EE₂ et d'E₂ sur le transcriptome des cellules gliales associées aux neurones à GnRH

Nous avons émis l'hypothèse que l'impact de l'EE₂ sur l'activité des neurones à GnRH-I pourrait être médié par les cellules gliales olfactives. Nous avons donc traité des cultures de placodes olfactives entre le 8^{ème} et 10^{ème} jour de cultures avec 17nM d'EE₂ afin d'étudier l'effet sur le transcriptome des cellules gliales olfactives [GFP+]. Dans cette étude nous ne mettons pas en évidence de gènes différentiellement exprimés entre nos conditions témoins et nos échantillons traités. La difficulté de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés peut s'expliquer par nos conditions expérimentales. En effet, la faible quantité de matériel biologique (compris entre 8,17.10⁻²pg/ μ L et 2,71.10⁻⁴pg/ μ L), le faible nombre de réplicats (2 à 4 par conditions) ainsi que le regroupement des PO, peuvent niveler les différences d'expressions géniques. Cependant nous mettons en évidence des groupes de gènes (ou cluster) dont l'expression varie dans le même sens, après un traitement aigu d'EE₂. Bien entendu il est difficile d'interpréter les effets de l'EE₂ sur les cellules gliales à partir de ces données de « clustering ». Ces résultats sont à prendre avec précaution et nécessitent une confirmation par RT-qPCR des tendances des diminutions ou des augmentations de l'expression des gènes associés à ces annotations biochimiques et fonctionnelles. Cependant cette analyse par « clustering » nous donne des « pistes » d'études biochimiques et/ou

fonctionnelles afin de déterminer les effets globaux de l'EE₂ sur ces cellules gliales associées aux neurones à GnRH.

IV. 2. a. Effet de l'E₂ et l'EE₂ sur le cytosquelette et les jonctions d'adhésions des cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I

Dans notre étude nous mettons en évidence qu'un traitement de 17nM d'EE₂ pendant 48h, réprime des « clusters de gènes » impliqués dans la signalisation des morphogènes Wnt, dans l'adhésion focale (points d'adhésions) et dans les jonctions d'adhésions intercellulaires. Les Jonctions adhérentes cellulaires sont des adhérences intercellulaires importantes pour le maintien de l'architecture tissulaire. Elles comprennent les molécules d'adhésion cellulaire (CAM), tel que les complexes cadhérine-caténine (selon la définition KEGG, **Annexe I**). Ce complexe est régulé positivement par la signalisation Wnt par inhibition de la dégradation de la bêta-caténine ; ce qui conduit au remodelage du cytosquelette et à des changements dans l'adhésion cellulaire et la motilité (selon la définition KEGG, **Annexe I**). Selon la définition KEGG (Annexe II), les points d'adhésions correspondent à des points de contact cellule-matrice extracellulaire, où des faisceaux de filaments d'actine sont ancrés à des récepteurs transmembranaires de la famille des intégrines par un complexe multi-moléculaire de protéines de plaque de jonction. Certains des constituants d'adhérences focales participent au lien structurel entre les récepteurs membranaires et le cytosquelette d'actine, tandis que d'autres sont des molécules de signalisation, tels que les protéines kinases et phosphatases. Ces événements de signalisation aboutissent à la réorganisation du cytosquelette d'actine, induisant des changements de morphologie cellulaire.

De manière intéressante nous montrons qu'un traitement à l'EE₂ induit l'expression de « clusters » de gènes impliqués dans le processus cellulaire qui dépend ou modifie le cytosquelette microtubulaire.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc qu'un traitement aigu d'EE₂ pourrait affecter la réorganisation du cytosquelette, c'est à dire la morphologie des cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I ; et plus spécifiquement pourrait avoir un impact sur « l'architecture tissulaire » en agissant sur les jonctions intercellulaires et les interactions cellules-matrices extracellulaires et cellules-cellules. En présence d'un traitement chronique de 17-β-oestradiol (E₂), une répression des groupes de gènes impliqués dans la régulation et l'organisation du cytosquelette microtubulaire a été détectée ; ce qui suggère également un effet de l'E₂ sur la morphologie des cellules gliales olfactives.

L'œstradiol est décrit dans la littérature en tant que modulateur de la morphologie astrocytaire (Parguez et al 1993, Micevych et al, 2010, Arevala et al, 2010). En effet cette morphologie varie dans l'APO avec le niveau d'œstradiol au cours du développement (Amateau et Mc Carthy 2002) mais également au cours du cycle sexuel chez l'adulte (Parduez 1993). L'œstradiol induit une augmentation du nombre de processus primaire astrocytaire (ou branchements) en contact avec les neurones *in vivo* et *in vitro* (Mc Carthy 2002, Olmos et al 1989, Torres-Aleman 1992, Yokusuka 2008, Murashov et al 2004). Les niveaux d'œstradiol modulent l'engainement des neurones par les cellules gliales GFAP en agissant également sur une molécule d'adhésion la PSA-NCAM (Parkash Kaur 2005, Parkash Kaur 2007). Celle-ci lie les cellules gliales astrocytaires avec les prolongements et/ou les corps cellulaires des neurones à GnRH-I dans la couche externe de l'EM (Parkash Kaur & al, 2005) et dans l'APO (Parkash Kaur et al, 2007), mais on retrouve également ce lien entre les OEC et les neurones à GnRH-I dans les cultures de placodes olfactives de souris (Franceschini et al 2012). En ce qui concerne les effets de xéno-oestrogènes, des études menées sur des cultures primaires d'astrocytes hypothalamiques mettent en évidence une augmentation de la surface GFAP positive en présence de nonylphenol à des doses allant de 10nM à 100nM (Yokosuka 2008). Des changements d'intensité de l'immunoréactivité à la GFAP en réponse à différentes concentrations de BPA allant de 10pM à 1µM ont également été décrits (Miyataka 2006).

Nos résultats sont donc en accord avec les données bibliographiques qui montrent un effet des substances œstrogéniques sur la morphologie des cellules gliales, en réorganisant le cytosquelette, mais également sur l'architecture tissulaire, en touchant les jonctions cellulaires. Bien entendu il est indispensable de confirmer nos données de « clustering » en menant des études morphométriques sur les OEC associées aux neurones à GnRH-I dans notre système de culture en présence et en absence d'EE₂, en analysant les effets sur la GFAP-ir, la GnRH-ir et potentiellement la PSA-NCAM-ir.

IV. 2. b. Effet de l'E₂ et de l'EE₂ sur l'apoptose et la prolifération des cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I

Dans notre étude nous montrons qu'un traitement aigu d'EE₂, de 17nM pendant 48h, entraîne une répression de groupes de gènes impliqués dans l'apoptose cellulaire, en touchant la voie de signalisation p53 et la voie de régulation des caspases. Il est admis que les œstrogènes préviennent ou initient la mort cellulaire d'origine naturelle (pour revue Mc Carthy et al 2009). Les œstrogènes sont connus pour exercer des effets neuro-protecteurs (Behl 2002; Brann et al. 2007; Garcia-Segura et al. 2001). Par exemple, l'oestradiol favorise la survie neuronale (Ormerod et al. 2004) et prévient l'apoptose neuronale (Linford and Dorsa 2002) *via* les cellules gliales (Dhandapani et Brann 2007). *In vitro*, il a été montré en condition ischémique que l'oestradiol (10nM de 17-β-oestradiol pendant 48h) a des effets protecteur sur les cellules gliales astrocytaires corticales médiés par les récepteurs ERα et/ou ERβ (Guo et al 2012). En effet en présence d'un inhibiteur des récepteurs nucléaires aux œstrogènes l'effet protecteur de l'E₂ est abolit (Guo et al 2012).

Selon notre étude, un traitement de 17nM d'EE₂ pendant 48h réprime les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et au contraire induit l'expression de groupe de gènes impliqués dans la mitose cellulaire. Tandis qu'un traitement chronique de 100nM de 17-β-estradiol réprime les gènes impliqués dans la mitose. Une étude de Garcia-Segura a mis en évidence que les estrogènes natifs régulent négativement la prolifération astrocytaire après lésion cérébrale (Garcia-Segura 1993). De même une étude menée sur des souris ovariectomisées, met en évidence qu'une supplémentation avec des faibles doses d'oestradiol réduit significativement la prolifération cellulaire au niveau du bulbe olfactif accessoire, tandis qu'une supplémentation avec des fortes doses induit un effet sur la survie cellulaire (Hoyk et al 2006). De nombreuses études mettent en évidence une augmentation de la prolifération des cellules gliales en présence d'oestradiol (Jung testas 1992, Jacobson 1981, Koehler 2005, Wang 2003, Soto 1991 et Krishnon 1993). De même, les xéno-estrogènes, telle que le Nonylphenol et le Bisphenol A, promeuvent la prolifération cellulaire et l'activité transcriptomique (Soto 199, Krishnon 1993).

Les effets opposés des œstrogènes en fonction de la région et des concentrations sont bien décrites dans la littérature (pour revue Mc Carthy 2009). Nos résultats de clustering nous amènent à la conclusion qu'un traitement aigu d'EE₂ induit une survie cellulaire et une prolifération des OEC, tandis qu'un traitement chronique d'E₂ réprime la mitose. Cependant

les analyses réalisées par FACS ne montrent pas d'effet de l'EE₂ après 48h sur la survie cellulaire et le pourcentage de cellules gliales. On peut donc supposer que l'effet de l'EE₂ sur la survie ou la prolifération cellulaire des OEC est minime et ne peut être détecté par cette approche. Si cet effet ne concerne pas l'ensemble des cellules qui composent l'explant, il peut être difficile de détecter une action sur 6%des cellules qui composent cette culture, et après seulement 48h d'incubation. Il serait donc nécessaire d'évaluer l'effet de l'EE₂ sur l'apoptose des OEC par un test de Tunnel et sur la prolifération cellulaire des OEC en utilisant des traitements aux BrDU à partir de cultures traitées avec des cinétiques de traitements croissantes.

IV. 2. c. Impact génomique des voies biochimiques impliquées dans la régulation post-traductionnelle des cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I par un traitement aigu d'EE₂

1. Régulation post-traductionnelle et répression de la régulation transcriptionnelle médiée par les récepteurs nucléaires aux œstrogènes

Dans notre étude nous mettons en évidence qu'un traitement de 17nM d'EE₂ pendant 48h révèle deux « clusters de gènes » qui codent majoritairement pour des phosphoprotéines. Ces résultats suggèrent un effet post-traductionnel de l'EE₂ par addition d'un groupe fonctionnel de phosphate. L'annotation des voies biochimiques et l'annotation fonctionnelle des deux clusters montrent un enrichissement de la voie de l'ubiquitination. Cette modification post-traductionnelle biochimique consiste à additionner des groupes de protéines, ce qui entraîne une dégradation des protéines par le protéosome. On détecte également une répression des gènes impliqués dans les modifications post-transcriptionnelles et dans la dégradation des ARN. De plus on observe une répression de la voie biochimique des récepteurs à l'œstradiol. Selon la définition GO cette voie biochimique concerne « Toute série de signaux moléculaires qui transmet de l'information à partir du réticulum endoplasmique vers le noyau, et qui entraîne un changement dans la régulation transcriptionnelle ». Ces résultats suggèrent donc qu'un traitement aigu d'EE₂ entraîne une diminution de la régulation transcriptionnelle médiée par les récepteurs nucléaires aux œstrogènes.

L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'impact d'un traitement de 48h avec 17nM d'EE₂ réprime ou induit majoritairement des groupes de gènes codant pour des protéines

impliquées dans des voies biochimiques de régulation post-traductionnelle et est corrélée avec une répression des groupes de gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle. Dans la littérature les études décrivent des effets des xénoestrogènes sur l'expression de gènes dont le produit est directement impliqué dans la fonction étudiée (action génomique) et/ou sur une action non génomique (pour revue Silva 2010, Sam De Coster 2012, Watson 2007). Ce second mécanisme concerne les interactions avec des signaux de transductions moléculaires en mobilisant le calcium intracellulaire ou en stimulant entre autre des kinases (tel que la PI3K et la PKB) et la cascade Src/Ras/Erk (Pour revue Sam De Coster, pour revue Silva 2010). Cette action non génomique de l'œstradiol et des dérivés synthétiques n'exclut pas la possibilité d'une influence indirecte sur l'expression des gènes (pour revue Silva 2010). Bien que des études traitent des réactions croisées entre ces voies génomiques et non génomiques (Pour revue Sam De Coster 2012, pour revue Silva 2010), aucune ne s'intéresse à un effet génomique des perturbateurs endocriniens dont l'impact physiologique serait médié principalement par des modifications post-traductionnelles.

2. Régulations épigénétiques

On détecte également un effet de l'EE₂ sur la répression des gènes impliqués dans la méthylation des histones. La méthylation des histones est une modification post-traductionnelle qui à pour conséquence une répression transcriptionnelle des gènes (pour revue Gore et al 2008, Muller et al 2012). Ce phénomène moléculaire régule l'expression des gènes sans altérer la séquence nucléotidique (pour revue Anway 2006, Bernal et al 2010) en modifiant chimiquement l'ADN et les histones qui compactent l'ADN dans le noyau (Bernal et al 2010). Ce système de régulation non génomique (pour revue Gore et al 2010) est dénommé régulation épigénétique (pour revue Anway 2006, Bernal et al 2010). Si cette empreinte génétique touche les cellules germinales elle est héréditaire (Crews et al 2008). Elle touche également des cellules mitotiques non germinales, comme dans notre étude, ce qui induit un polymorphisme phénotypique appelé également « plasticité phénotypique » (Crews et al 2008). Des études ont déjà mis en évidence l'impact de perturbateurs endocriniens sur le développement et le bon fonctionnement de systèmes neuroendocrines par une régulation épigénétique cependant les gènes ciblés n'ont pas encore été mis en évidence (Pour revue Crews et al 2008, Gore et al 2008).

Dans notre étude nous détectons une répression de groupe de gènes impliqués dans le complexe MLL1, mixed-lineage leukemia histone methylases. Ce complexe multi-protéique

méthyle les histones et joue un rôle crucial dans l'activation des gènes (Dou et al 2006). Il a été montré sur des souris adultes qu'une déficience en MLL1 favorise la différenciation gliale des cellules souches neurales de la zone sous ventriculaire et altère gravement la différenciation neuronale (Lin et al 2009). Récemment il a été mis en évidence qu'en présence de 17- β -estradiol le complexe MLL1 pouvait être recruté par les ER et régulerait l'activité transcriptomique des gènes (Khair ul et al 2013).

Ces résultats donnent pour le long terme des pistes de mode d'action d'un traitement aigu d'EE₂ sur les cellules gliales olfactives dans notre système de culture. En effet si l'on confirme une action de l'EE₂ sur les différents processus biologiques cités ci-dessus, il pourrait être intéressant d'étudier si ces effets sont principalement dus à des régulations post-traductionnelles et épigénétiques.

V. Conclusion

Notre étude ne nous permet pas de conclure de l'effet de l'EE₂ sur le transcriptome de ces cellules gliales. En effet nous ne détectons pas de gènes différentiellement exprimés entre nos conditions traitées et notre condition contrôle. Cependant, nous mettons en évidence des groupes de gènes dont l'expression varie dans le même sens lorsque l'on traite les cultures de PO à l'EE₂ pendant 48h. Les annotations des voies biochimiques et les annotations fonctionnelles associées à ces groupes de gènes donnent des pistes d'études. Ainsi il serait intéressant d'étudier les effets de l'EE₂ sur: i) la morphologie des cellules gliales et leurs capacité d'engainer les neurones à GnRH-I, ii) la survie et la prolifération de ces cellules gliales, iii) les régulations post-traductionnelles et épigénétique qui pourraient être mises en jeux. Il est donc indispensable de confirmer ces données de « clustering » associées « aux pathways » par des études fonctionnelles, cependant nous pouvons supposer que si ces voies biochimiques sont effectivement altérées, cela pourrait avoir un impact sur le développement et la régulation des neurones à GnRH-I ; sujet que nous développerons dans la partie discussion de ce manuscrit.

DISCUSSION

Nous avons mis en évidence que les neurones à GnRH-I possèdent un environnement glial au cours de leur migration. La caractérisation de ces cellules nous ont permis de les identifier autant que des cellules gliales olfactives engainantes (OEC). Ces cellules sont caractérisées dans la littérature par leurs répertoires d'expressions de marqueurs antigéniques mixtes d'astrocytes et de cellules de Schwann mais également par leur capacité à engainer les axones.

I. Les neurones à GnRH-I possèdent-il un environnement glial avant d'entamer leur migration nasale ?

Dans le second article présenté dans le chapitre I de cette thèse, nous ne mettons pas en évidence de progéniteurs pluripotent de ces cellules gliales BLBP immuno-réactives dans l'organe voméronasal (VNO). Cette observation est en accord avec les données de Murdoch et Roskams (2007, 2008) qui ne mettent pas en évidence de progéniteurs BLBP positif dans l'épithélium du VNO chez la souris à E10,5 et E13,5. En effet seules des cellules multipotentes de type glie radiaire (RGPL), sont retrouvées dans ces tissus au cours du développement embryonnaire (Murdoch et Roskams 2007 et Murdoch et Roskams 2008). En effet, à ces stades précoces du développement, l'épithélium olfactif et voméronasal contient des progéniteurs en prolifération, n'exprimant pas d'antigène de lignée neuronale ou gliale mais exprime la Nestin (Murdoch 2007). Dans notre première étude nous mettons en évidence des cellules hGFAP-GFP dans l'épithélium voméronasal à partir de E13,5. Cependant nous ne pouvons pas affirmer que ces cellules soient des cellules gliales et non des RGPL. En effet dans cette étude nous avons utilisé une lignée de souris transgénique exprimant le GFP sous le contrôle du promoteur humain de la GFAP, connus pour être exprimé dans le cerveau par la glie radiaire mutipotentes, contrairement au promoteur souris de la GFAP, et dans les cellules gliales murent (Nolte et al 2001,(Morita et al. 1997)Wang et Bordey 2008,(Brenner and Messing 1996) Ikenaka, 1997). Cependant il n'existe pas de donnée(s) sur l'expression du promoteur de la GFAP humaine dans le système olfactif en développement. Il serait donc nécessaire de vérifier si les cellules hGFAP-GFP que nous détectons dans le VNO sont des ces cellules multipotentes RGPL. Nous pouvons également nous interroger sur le devenir phénotypique des RGPL du voméronasal ; pourraient-elles se différencier en neurones à GnRH-I et en cellules gliales ? Les études récemment publiées sur l'origine des neurones à GnRH-I et des OEC (Barraud et al. 2010; Forni et al. 2011b; Katoh et al. 2011) nous laissent supposer que cela concernerait qu'une très faible proportion des neurones à GNRH-I. En effet seulement 30% des neurones à GnRH-I proviennent de la crête neurale, région dont sont

originaires la globalité des OEC (Forni et al 2011b). Le fait que Forni et al. (2011b) ne mettent pas en évidence de cellules exprimant des marqueurs gliaux originaires de la PO dans le septum nasal, signifie que les progéniteurs des neurones à GnRH-I provenant de la placode olfactive ne fourniraient que des cellules neuronales.

II. Les cellules gliales olfactives engainantes accompagnent-elles les neurones à GnRH-I dans l'APO et l'hypothalamus ?

Nous avons mis en évidence que les neurones à GnRH-I possèdent un environnement glial tout au long de leur migration nasale, en immunomarquant la BLBP et la GFP exprimé sous le contrôle de la GFAP ; mais aussi dans le télencéphale, à l'aide de l'immunomarquage de la BLBP. Quelques études de microscopie électronique mettent en évidence la présence de cellules gliales autour des nerfs voméronasaux chez le rat au cours du développement embryonnaire (Fraher 1982) post-natal (Ichikawa and Osada 1995) et chez l'adulte (Raisman 1985), mais aussi le long de la partie télencéphalique du nerf terminal (Zheng et Jourdan 1993). Mais qu'en est-il de la partie diencephalique du nerf terminal? En effet nous mettons en évidence dans le diencephale, l'existence de cellules BLBP immunoréactives, apposées aux axones périphériques immunoréactifs, de morphologie similaire aux OEC. Cependant la BLBP étant également exprimé par la glie radiaire dans le cerveau en développement (Feng *et al.*, 1994; Anthony *et al.*, 2004; Anthony & Heintz, 2007), nous ne pouvons pas affirmer que ces cellules soient des OEC. Afin de déterminer si des cellules gliales provenant de la crête neurale migrent dans l'hypothalamus, deux méthodes de lignage des progéniteurs peuvent être utilisées : soit en injectant un traceur rétroviral dans la fosse nasale (Joyner et Zervas 2006) à E10,5, avant le début de migration des progéniteurs des OEC (Miller et al 2010). On pourrait également utiliser des souris transgéniques *ROSA*, chez lesquels la cartographie du destin cellulaire est faite en utilisant les promoteurs spécifiques des progéniteurs à l'aide d'un site de recombinaison Cre.

Récemment, Blanchart et al (2011) ont utilisé un rétrovirus eGFP in utero au niveau de la fosse nasale chez des souris à partir du 11^{ème} jour de gestation, cependant l'étude ne détecte à E18 et P30 la présence de cellules eGFP au-delà de la couche externe du BO. Ce pendant les marquages dirigés contre la GnRH-I sur des coupes de têtes d'embryons âgés de 15 jours *in utero*, ne détecte pas la présence de cellules GnRH-ir et eGFP positive, ce qui suggère que l'injection du rétrovirus pourrait être faite latéralement, ne permettant pas au virus d'infecter les progéniteurs neuronaux et gliaux qui proviennent de la partie médiale de la fosse nasale.

Quelques mois plutôt, Forni et al (2011b), ont utilisés une lignée de souris transgénique permettant de tracer les cellules provenant de la crête neurale (souris transgénique *Wnt1Cre-βGal*). Ils mettent clairement en évidence à E16,5 la présence de cellules β-Gal dans le cerveau doublement-marqués à la GnRH-I. On peut observer sur cette figure du marquage βGAL à proximité de ces neurones mais n'étant pas immuno-réactif à la GnRH-I. L'étude ne caractérise pas le phénotype de ces cellules et n'en fait pas mention dans le papier. Il serait intéressant de vérifier si ces cellules expriment des marqueurs gliaux, et de vérifier leur trajet de migration en suivant la migration des cellules *wnt1cre* en « time lapses » sur des tranches de cerveaux d'embryons de souris (Giacobini et al. 2008).

III. Les cellules gliales olfactives engainantes permettent-elles la migration des neurones à GnRH-I ?

Comme nous l'avons mis en évidence dans le premier papier de cette thèse, les cellules gliales [GFP+], qui forment le microenvironnement des neurones à GnRH-I, expriment des facteurs connus pour intervenir dans la migration neuronale telle que *Nelf* et la *Sémaphorine 4D*. Les OEC expriment également la sémaphorine 3A (Schwartz et al 2000) les éphrines (St John et al 2002) et les NCAM (Miragall 1989, 1988) connus pour intervenir dans la migration des neurones à GnRH-I (pour revue Wray 2002, Wierman 2010, Wray 2010).

La majorité de ces facteurs sont indispensable dans l'extension des axones olfactifs/voméronasaux, comme l'illustre le syndrome de Kallmann qui présente pour phénotype un défaut de migration des neurones à GnRH-I et un défaut d'extension des axones voméronaux et olfactifs (pour revue Pittelou et al 2010). Les OEC sont indispensable à la mise en place des axones olfactifs/voméronasaux (Nieto-Sampedro and Ramon-Cueto 1993, Ramon Cueto and Nietosampedro 1994) ; on peut en déduire qu'indirectement ces cellules interviennent dans la migration de ces neurones.

Les cellules gliales [GFP+] que nous avons caractérisé dans le premier chapitre de cette thèse, expriment la *sémaphorine 4D*, nécessaire à la migration des neurones à GnRH-I ; et ne semble pas intervenir dans la migration des axones voméronasaux. En effet, l'absence d'expression de ce facteur, chez les souris KO, entraîne un défaut de migration des neurones à GnRH-I au cours du développement embryonnaire (Giacobini et al. 2008). Ces observations suggèrent donc que les axones ne sont pas suffisant pour la migration des neurones à GnRH-I et renforce notre hypothèse quand à l'importance des OEC dans la migration de ces neurones.

Afin de pouvoir tester notre hypothèse il serait nécessaire dans un premier temps de vérifier si les OEC sont suffisantes à la migration de ces neurones. Pour se faire on pourrait utiliser une lignée cellulaire de neurones à GnRH-I qui possèdent la capacité de migrer, les Gn11 ; que l'on co-cultiverais avec des cultures primaire d'OEC ou du milieu conditionné d'OEC. Cette première approche nous permettrait de distinguer l'implication de ces cellules gliales dans la migration de ces neurones *via* des molécules d'adhésion ou *via* des facteurs diffusibles. Afin de pouvoir vérifier que ces cellules gliales soient indispensables à la migration de ces neurones plusieurs modèles animaux pourraient être utilisé :

-1) une lignée de souris transgéniques permettant l'ablation des cellules gliales, tel que les souris *Gfap-Tk* (Bush et al 1999), qui nous permet d'induire l'ablation des cellules gliales en prolifération. Cependant ce type de lignée risque de toucher l'ensemble des cellules qui expriment la *Gfap* à des stades immatures, ce qui concerne également les cellules multipotentes RGPL.

-2) une lignée de souris transgéniques qui nous permet d'induire un défaut d'expression d'un facteur indispensable à la migration de ces neurones et non pas pour la mise en place des axones voméronasaux, tel que la *Sémaphorine 4D*, sous le contrôle de la BLBP.

Ces deux types de lignée permettraient d'étudier la migration précoce des neurones à GnRH-I dans le septum nasal. En effet pour les deux modèles on risque de toucher des cellules gliales du cerveau. Il est donc indispensable de mettre en évidence un marqueur spécifique de ces cellules gliales à l'aide par exemple, d'une analyse différentielle du transcriptome des OEC et d'astrocytes hypothalamiques. Nous pouvons également, à partir de nos données de transcriptome des cellules gliales [GFP+] cultivées en condition témoin nous pouvons réaliser une méta-analyse avec des données de transcriptome d'astrocytes déjà publiées (ref).

IV. Les cellules gliales olfactives engainantes permettent-elles la différenciation et la régulation de l'activité des neurones à GnRH-I ?

Nous mettons en évidence une corrélation entre la formation d'un réseau neuro-glial (*Geller et al 2012*) et l'acquisition et la maturation de l'activité sécrétrice des neurones à GnRH-I *in vitro* sur les cultures de PO après 10 jours de cultures (Constantin et al 2009). Au cours de ma thèse j'ai participé à une étude qui permet de mettre en évidence dans des cultures de PO âgés de 7 à 10 jours, le rôle des cellules gliales de type OEC dans la régulation de la sécrétion épisodique de GnRH-I, en impliquant des communications directes entre-elles composé de connexine 43 (Annexe II). Cette étude nous conforte dans l'idée que les cellules gliales

olfactives OEC feraient partie du microenvironnement hypothalamique des neurones à GnRH-I, comme nous l'avons développée dans la partie II de cette discussion. Récemment il a été mis en évidence sous forme de présentation affichée au congrès de la SNE de 2012, la présence de cellules gliales de morphologie astrocytaire et de phénotypes immatures à proximité des neurones à GnRH- I dans l'APO de souris (Sharif 2012), qui pourraient s'apparenter à des cellules gliales olfactives. Cependant il ne faut pas oublier que les OEC possèdent des caractéristiques communes avec des astrocytes existants dans l'environnement des neurones à GnRH-I *in vivo*. De plus, une revue publié en 1999 décrit les ressemblances frappantes entre les OEC et les tancytes qui bordent le troisième ventricule (pour revue Gudino-Cabera 1999), connus pour leurs implication dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH-I au niveau de l'éminence médiane (pour revue Prevot et al 2010). Les deux types cellulaires présentent un profil de cellules gliales immatures, par le profil antigénique (en produisant le récepteur p75NTR, l'antigène O4, les protéines GFAP, la PSA-NCAM) et par leur capacité de proliférer à partir de tissus adultes. De plus elles induisent la croissance des neurites, et guident et engainent les neurites en croissances. Ainsi ils considèrent ces cellules, avec également les cellules gliales de la glande pinéale, les cellules de la rétine de Müller, et les cellules gliales de Bergmann, comme un groupe distinct de cellules gliales permettant la croissance du système nerveux central, qu'ils nomment « macroglia aldynoglia ».

Ainsi même si les OEC ne migrent pas dans le diencephale, elles possèdent des caractéristiques communes avec les tancytes et avec les astrocytes, et pourraient donc recréer dans ce modèle *in vitro* un type de régulation hypothalamique

V. Ce système est-il dérégulé en présence d'un perturbateur endocrinien ?

. Notre étude de transcriptome montre que lorsque l'on implique un traitement de 48h d'EE2, nous mettons en évidence des « pathways » impliqués dans la réorganisation du cytosquelette, et des jonctions d'adhérences cellulaires (NCAM). La PSA-NCAM est connue pour intervenir dans la migration des neurones à GnRH-I le long des axones (Franceschini et al. 2010) mais également dans la régulation de l'activité des neurones à GnRH-I au niveau hypothalamique (Franceschini et al. 2010). Comme nous l'avons vu dans cette discussion, les OEC sont PSA-NCAM-immunoréactives. Au sein de notre équipe, il a été mis en évidence dans les cultures d'explants de placodes olfactives une association étroite entre les cellules gliales GFAP-immunoréactive et les neurones à GnRH-I exprimant toutes les deux la PSA-NCAM

(Franceschini et al. 2010). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet de l'EE2 sur le marquage PSA-NCAM des neurones à GnRH-I et des cellules gliales qui leurs sont associées dans notre système de culture. Cette analyse devrait être réalisée sur des cultures âgées de 0 à 6 jours de développement in vitro, à la période de migration des neurones à GnRH-I. Elle pourrait être également plus tardivement, au moment de la maturation du profil de sécrétion de ces neurones.

CONCLUSION

Au cours de cette thèse nous avons mis en évidence la présence d'un environnement glial associé aux neurones à GnRH-I en migration. La caractérisation de ces cellules gliales nous a permis de les identifier en tant que cellules gliales olfactives engainantes (OEC). Les études que nous avons menées *in vivo* révèlent la plasticité du phénotype au cours de leur migration. De manière intéressante elles expriment des molécules d'adhésion mais également des facteurs diffusibles nécessaires à la migration de ces neurones. De plus, la communication de ces cellules gliales par jonctions communicantes régule l'activité du réseau neuronal de GnRH-I. Cependant plusieurs questions restent à élucider : Ces cellules gliales sont-elles indispensables et suffisantes à la migration de ces neurones ? Forment-elles une partie du microenvironnement gliale hypothalamique de ces neurones à l'âge adulte ? Régulent-elles *in vivo* l'activité des neurones à GnRH-I chez l'adulte ?

En ce qui concerne le travail réalisé sur les PE, à ce stade de l'étude il est difficile de conclure de l'effet de l'EE₂ sur le transcriptome de ces cellules gliales, cependant nos résultats préliminaires, nous interrogent quant à la possibilité qu'un traitement de 48h d'EE₂ module l'activité des neurones à GnRH-I et leur migration en altérant leur association via des molécules d'adhésion cellulaire.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse nous permettent de conclure que les neurones à GnRH-I possèdent un environnement glial tout au long de leur migration, et suggère l'implication des cellules gliales olfactives engainantes dans l'ontogenèse de ces neurones et dans leur régulation.

Bibliographie

- Agca E, Batailler M, Tillet Y, Chemineau P, Duittoz AH. 2008. Modulation of estrogen receptors during development inhibits neurogenesis of precursors to GnRH-1 neurones: in vitro studies with explants of ovine olfactory placode. *Brain research* 1223:34-41.
- Anthony TE, Heintz N. 2007. The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects. *The Journal of comparative neurology* 500:368-83.
- Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N. 2004. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron* 41:881-90.
- Astic L, Pellier-Monnin V, Godinot F. 1998. Spatio-temporal patterns of ensheathing cell differentiation in the rat olfactory system during development. *Neuroscience* 84:295-307.
- Baba H, Nakahira K, Morita N, Tanaka F, Akita H, Ikenaka K. 1997. GFAP gene expression during development of astrocyte. *Dev Neurosci* 19:49-57.
- Baker BL, Yu Y. 1976. Distribution of growth hormone-release-inhibiting hormone (somatostatin) in the rat brain as observed with immunocytochemistry. *Anat Rec* 186:343-55.
- Baker CV, Bronner-Fraser M. 1997. The origins of the neural crest. Part I: embryonic induction. *Mechanisms of development* 69:3-11.
- Baker CV, Bronner-Fraser M, Le Douarin NM, Teillet MA. 1997. Early- and late-migrating cranial neural crest cell populations have equivalent developmental potential in vivo. *Development* 124:3077-87.
- Barnett SC. 2004. Olfactory ensheathing cells: unique glial cell types? *Journal of neurotrauma* 21:375-82.
- Barraud P, Seferiadis AA, Tyson LD, Zwart MF, Szabo-Rogers HL, Ruhrberg C, Liu KJ, Baker CV. 2010. Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:21040-5.
- Beauvillain JC. 2008. Le cerveau et la reproduction : le réseau neuronal à GnRH
- Brain and reproduction: the GnRH neuronal network. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie Endocrinologie* 10:94-104.
- Blanchart A, Martin-Lopez E, De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L. 2011. Peripheral contributions to olfactory bulb cell populations (migrations towards the olfactory bulb). *Glia* 59:278-92.
- Bless EP, Walker HJ, Yu KW, Knoll JG, Moenter SM, Schwarting GA, Tobet SA. 2005. Live view of gonadotropin-releasing hormone containing neuron migration. *Endocrinology* 146:463-8.
- Brenner M, Messing A. 1996. GFAP Transgenic Mice. *Methods* 10:351-64.
- Caldani M, Antoine M, Batailler M, Duittoz A. 1995. Ontogeny of GnRH systems. *Journal of reproduction and fertility Supplement* 49:147-62.
- Caldani M, Batailler M, Jourdan F. 1987. The sheep terminal nerve: coexistence of LHRH- and AChE-containing neurons. *Neuroscience letters* 83:221-6.
- Carson C, Murdoch B, Roskams AJ. 2006. Notch 2 and Notch 1/3 segregate to neuronal and glial lineages of the developing olfactory epithelium. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235:1678-88.

- Chu Z, Andrade J, Shupnik MA, Moenter SM. 2009. Differential regulation of gonadotropin-releasing hormone neuron activity and membrane properties by acutely applied estradiol: dependence on dose and estrogen receptor subtype. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:5616-27.
- Chuah MI, Au C. 1991. Olfactory Schwann cells are derived from precursor cells in the olfactory epithelium. *Journal of neuroscience research* 29:172-80.
- Chung WC, Matthews TA, Tata BK, Tsai PS. 2010. Compound deficiencies in multiple fibroblast growth factor signalling components differentially impact the murine gonadotrophin-releasing hormone system. *J Neuroendocrinol* 22:944-50.
- Chung WC, Moyle SS, Tsai PS. 2008. Fibroblast growth factor 8 signaling through fibroblast growth factor receptor 1 is required for the emergence of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 149:4997-5003.
- Clarke IJ. 2011. Control of GnRH secretion: one step back. *Front Neuroendocrinol* 32:367-75.
- Constantin S, Caraty A, Wray S, Duittoz AH. 2009. Development of gonadotropin-releasing hormone-1 secretion in mouse nasal explants. *Endocrinology* 150:3221-7.
- Cummings DM, Brunjes PC. 1995. Migrating luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons and processes are associated with a substrate that expresses S100. *Brain Res Dev Brain Res* 88:148-57.
- Cuschieri A, Bannister LH. 1975. The development of the olfactory mucosa in the mouse: electron microscopy. *Journal of anatomy* 119:471-98.
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH. 2008. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149:3926-32.
- Daikoku-Ishido H, Okamura Y, Yanaihara N, Daikoku S. 1990. Development of the hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone-containing neuron system in the rat: in vivo and in transplantation studies. *Developmental biology* 140:374-87.
- De Carlos JA, Lopez-Mascaraque L, Valverde F. 1995. The telencephalic vesicles are innervated by olfactory placode-derived cells: a possible mechanism to induce neocortical development. *Neuroscience* 68:1167-78.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews* 30:293-342.
- Dickerson SM, Cunningham SL, Patisaul HB, Woller MJ, Gore AC. 2011. Endocrine disruption of brain sexual differentiation by developmental PCB exposure. *Endocrinology* 152:581-94.
- Doucette JR. 1984. The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *The Anatomical record* 210:385-91.
- Doucette R. 1989. Development of the nerve fiber layer in the olfactory bulb of mouse embryos. *J Comp Neurol* 285:514-27.
- Doucette R. 1990. Glial influences on axonal growth in the primary olfactory system. *Glia* 3:433-49.
- Doucette R. 1993. Glial progenitor cells of the nerve fiber layer of the olfactory bulb: effect of astrocyte growth media. *Journal of neuroscience research* 35:274-87.
- Duittoz AH, Batailler M. 2000. Pulsatile GnRH secretion from primary cultures of sheep olfactory placode explants. *J Reprod Fertil* 120:391-6.
- Duittoz AH, Batailler M, Caldani M. 1997. Primary cell culture of LHRH neurones from embryonic olfactory placode in the sheep (*Ovis aries*). *J Neuroendocrinol* 9:669-75.
- Farbman AI. 1990. Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends Neurosci* 13:362-5.

- Farbman AI, Buchholz JA, Walters E, Margolis FL. 1998. Does olfactory marker protein participate in olfactory neurogenesis? *Annals of the New York Academy of Sciences* 855:248-51.
- Feng L, Hatten ME, Heintz N. 1994. Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12:895-908.
- Forni PE, Fornaro M, Guenette S, Wray S. 2011a. A role for FE65 in controlling GnRH-1 neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:480-91.
- Forni PE, Taylor-Burds C, Melvin VS, Williams T, Wray S. 2011b. Neural crest and ectodermal cells intermix in the nasal placode to give rise to GnRH-1 neurons, sensory neurons, and olfactory ensheathing cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:6915-27.
- Fraher JP. 1982. The ultrastructure of sheath cells in developing rat vomeronasal nerve. *Journal of anatomy* 134:149-68.
- Franceschini I, Desroziers E, Caraty A, Duittoz A. 2010. The intimate relationship of gonadotropin-releasing hormone neurons with the polysialylated neural cell adhesion molecule revisited across development and adult plasticity. *The European journal of neuroscience* 32:2031-41.
- Franceschini IA, Barnett SC. 1996. Low-affinity NGF-receptor and E-N-CAM expression define two types of olfactory nerve ensheathing cells that share a common lineage. *Dev Biol* 173:327-43.
- Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calza L, Dessi-Fulgheri F, Fernandez M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y and others. 2012. Endocrine disrupters: a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *J Neuroendocrinol* 24:144-59.
- Fueshko S, Wray S. 1994. LHRH cells migrate on peripherin fibers in embryonic olfactory explant cultures: an in vitro model for neurophilic neuronal migration. *Developmental biology* 166:331-48.
- Fueshko SM, Key S, Wray S. 1998. GABA inhibits migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in embryonic olfactory explants. *J Neurosci* 18:2560-9.
- Funabashi T, Daikoku S, Shinohara K, Kimura F. 2000. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion is an inherent function of GnRH neurons, as revealed by the culture of medial olfactory placode obtained from embryonic rats. *Neuroendocrinology* 71:138-44.
- Galbiati M, Magnaghi V, Martini L, Melcangi RC. 2001. Hypothalamic transforming growth factor beta1 and basic fibroblast growth factor mRNA expression is modified during the rat oestrous cycle. *J Neuroendocrinol* 13:483-9.
- Galbiati M, Martini L, Melcangi RC. 2002. Oestrogens, via transforming growth factor alpha, modulate basic fibroblast growth factor synthesis in hypothalamic astrocytes: in vitro observations. *J Neuroendocrinol* 14:829-35.
- Galbiati M, Zanisi M, Messi E, Cavarretta I, Martini L, Melcangi RC. 1996. Transforming growth factor-beta and astrocytic conditioned medium influence luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in the hypothalamic cell line GT1. *Endocrinology* 137:5605-9.
- Geller S, Kolasa E, Tillet Y, Duittoz A, Vaudin P. 2013. Olfactory ensheathing cells form the microenvironment of migrating GnRH-1 neurons during mouse development. *Glia* 61:550-66.
- Giacobini P, Kopin AS, Beart PM, Mercer LD, Fasolo A, Wray S. 2004. Cholecystokinin modulates migration of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *J Neurosci* 24:4737-48.

- Giacobini P, Messina A, Morello F, Ferraris N, Corso S, Penachioni J, Giordano S, Tamagnone L, Fasolo A. 2008. Semaphorin 4D regulates gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration through PlexinB1-Met complex. *J Cell Biol* 183:555-66.
- Gore AC, Patisaul HB. 2010. Neuroendocrine disruption: historical roots, current progress, questions for the future. *Frontiers in neuroendocrinology* 31:395-9.
- Gore AC, Wu TJ, Oung T, Lee JB, Woller MJ. 2002. A novel mechanism for endocrine-disrupting effects of polychlorinated biphenyls: direct effects on gonadotropin-releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 14:814-23.
- Graziadei PP, Monti Graziadei GA. 1985. Neurogenesis and plasticity of the olfactory sensory neurons. *Annals of the New York Academy of Sciences* 457:127-42.
- Gross DS. 1976. Distribution of gonadotropin-releasing hormone in the mouse brain as revealed by immunohistochemistry. *Endocrinology* 98:1408-17.
- Harden MV, Pereiro L, Ramialison M, Wittbrodt J, Prasad MK, McCallion AS, Whitlock KE. 2012. Close association of olfactory placode precursors and cranial neural crest cells does not predestine cell mixing. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 241:1143-54.
- Herbison AE. 1998. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine reviews* 19:302-30.
- Hilal EM, Chen JH, Silverman AJ. 1996. Joint migration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and neuropeptide Y (NPY) neurons from olfactory placode to central nervous system. *J Neurobiol* 31:487-502.
- Jasoni CL, Porteous RW, Herbison AE. 2009. Anatomical location of mature GnRH neurons corresponds with their birthdate in the developing mouse. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238:524-31.
- Jennes L. 1987. The nervus terminalis in the mouse: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 519:165-73.
- Katoh H, Shibata S, Fukuda K, Sato M, Satoh E, Nagoshi N, Minematsu T, Matsuzaki Y, Akazawa C, Toyama Y and others. 2011. The dual origin of the peripheral olfactory system: placode and neural crest. *Mol Brain* 4:34.
- Kawauchi S, Shou J, Santos R, Hebert JM, McConnell SK, Mason I, Calof AL. 2005. Fgf8 expression defines a morphogenetic center required for olfactory neurogenesis and nasal cavity development in the mouse. *Development* 132:5211-23.
- Key S, Wray S. 2000. Two olfactory placode derived galanin subpopulations: luteinizing hormone-releasing hormone neurones and vomeronasal cells. *J Neuroendocrinol* 12:535-45.
- LaMantia AS, Bhasin N, Rhodes K, Heemskerk J. 2000. Mesenchymal/epithelial induction mediates olfactory pathway formation. *Neuron* 28:411-25.
- Layman WS, Hurd EA, Martin DM. 2011. Reproductive dysfunction and decreased GnRH neurogenesis in a mouse model of CHARGE syndrome. *Human molecular genetics* 20:3138-50.
- Levine JE, Ramirez VD. 1982. Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology* 111:1439-48.
- Lindsay SL, Riddell JS, Barnett SC. Olfactory mucosa for transplant-mediated repair: a complex tissue for a complex injury? *Glia* 58:125-34.
- Livne I, Gibson MJ, Silverman AJ. 1993. Biochemical differentiation and intercellular interactions of migratory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells in the mouse. *Dev Biol* 159:643-56.

- Lopez FJ, Merchenthaler IJ, Moretto M, Negro-Vilar A. 1998. Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator. *Cell Mol Neurobiol* 18:125-46.
- MacColl G, Quinton R, Bouloux PM. 2002. GnRH neuronal development: insights into hypogonadotrophic hypogonadism. *Trends Endocrinol Metab* 13:112-8.
- Marin-Padilla M. 1989. Abnormal Purkinje cell morphogenesis in human renal agenesis. A Golgi study. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 48:448-61.
- Marin-Padilla M, Amieva MR. 1989. Early neurogenesis of the mouse olfactory nerve: Golgi and electron microscopic studies. *The Journal of comparative neurology* 288:339-52.
- Melcangi RC, Galbiati M, Messi E, Piva F, Martini L, Motta M. 1995. Type 1 astrocytes influence luteinizing hormone-releasing hormone release from the hypothalamic cell line GT1-1: is transforming growth factor-beta the principle involved? *Endocrinology* 136:679-86.
- Miller AM, Treloar HB, Greer CA. 2010. Composition of the migratory mass during development of the olfactory nerve. *J Comp Neurol* 518:4825-41.
- Miraoui H, Dwyer A, Pitteloud N. 2011. Role of fibroblast growth factor (FGF) signaling in the neuroendocrine control of human reproduction. *Molecular and cellular endocrinology* 346:37-43.
- Morita N, Nakahira K, Baba H, Akita H, Kumada T, Ogawa M, Nakajima K, Kawata M, Mikoshiba K, Ikenaka K. 1997. Astrocytic lineage analysis by detection of GFAP promoter activity in vitro. *Dev Neurosci* 19:210-8.
- Mulrenin EM, Witkin JW, Silverman AJ. 1999. Embryonic development of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system in the chick: a spatio-temporal analysis of GnRH neuronal generation, site of origin, and migration. *Endocrinology* 140:422-33.
- Murdoch B, Roskams AJ. 2007. Olfactory epithelium progenitors: insights from transgenic mice and in vitro biology. *Journal of molecular histology* 38:581-99.
- Murdoch B, Roskams AJ. 2008. A novel embryonic nestin-expressing radial glia-like progenitor gives rise to zonally restricted olfactory and vomeronasal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:4271-82.
- Negoescu A, Labat-Moleur F, Lorimier P, Lamarcq L, Guillermet C, Chambaz E, Brambilla E. 1994. F(ab) secondary antibodies: a general method for double immunolabeling with primary antisera from the same species. Efficiency control by chemiluminescence. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 42:433-7.
- Noel SD, Keen KL, Baumann DI, Filardo EJ, Terasawa E. 2009. Involvement of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) in rapid action of estrogen in primate LHRH neurons. *Mol Endocrinol* 23:349-59.
- Oelschlager HA. 1988. Persistence of the nervus terminalis in adult bats: a morphological and phylogenetical approach. *Brain, behavior and evolution* 32:330-9.
- Ojeda SR, Prevot V, Heger S, Lomniczi A, Dziedzic B, Mungenast A. 2003. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Annals of medicine* 35:244-55.
- Parhar I, Ogawa S, Kitahashi T. 2012. RFamide peptides as mediators in environmental control of GnRH neurons. *Prog Neurobiol* 98:176-96.
- Pellitteri R, Spatzuza M, Stanzani S, Zaccheo D. 2010. Biomarkers expression in rat olfactory ensheathing cells. *Frontiers in bioscience* 2:289-98.
- Pillon D, Cadiou V, Angulo L, Duittoz AH. 2012. Maternal exposure to 17-alpha-ethinylestradiol alters embryonic development of GnRH-1 neurons in mouse. *Brain research* 1433:29-37.

- Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing A, Eliseenkova AV, Ma J, Ibrahimi OA, Metzger DL, Hayes FJ, Dwyer AA, Hughes VA and others. 2006. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6281-6.
- Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY and others. 2007. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17447-52.
- Prevot V, Dehouck B, Poulain P, Beauvillain JC, Buee-Scherrer V, Bouret S. 2007. Neuronal-glial-endothelial interactions and cell plasticity in the postnatal hypothalamus: implications for the neuroendocrine control of reproduction. *Psychoneuroendocrinology* 32 Suppl 1:S46-51.
- Ramon-Cueto A, Avila J. 1998. Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain research bulletin* 46:175-87.
- Ramon-Cueto A, Perez J, Nieto-Sampedro M. 1993. In vitro enfolding of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *The European journal of neuroscience* 5:1172-80.
- Richter M, Westendorf K, Roskams AJ. 2008. Culturing olfactory ensheathing cells from the mouse olfactory epithelium. *Methods in molecular biology* 438:95-102.
- Ronnekleiv OK, Resko JA. 1990. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone-containing neurons in early fetal development of rhesus macaques. *Endocrinology* 126:498-511.
- Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. 1989. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res* 6:311-26.
- Schwanzel-Fukuda M, Morrell JI, Pfaff DW. 1985. Ontogenesis of neurons producing luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the nervus terminalis of the rat. *The Journal of comparative neurology* 238:348-64.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. 1989. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338:161-4.
- Schwanzel-Fukuda M, Silverman AJ. 1980. The nervus terminalis of the guinea pig: a new luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal system. *The Journal of comparative neurology* 191:213-25.
- Sharif A. 2012. Postnatal gliogenesis is required for female sexual maturation and adult reproduction function. 38ème Colloque de la société de neuroendocrinologie Poster:40.
- Shepherd GM, Greer CA, Mazzarello P, Sassoe-Pognetto M. 2011. The first images of nerve cells: Golgi on the olfactory bulb 1875. *Brain research reviews* 66:92-105.
- Shyu C, Cavileer TD, Nagler JJ, Ytreberg FM. 2011. Computational estimation of rainbow trout estrogen receptor binding affinities for environmental estrogens. *Toxicology and applied pharmacology* 250:322-6.
- Spergel DJ, Kruth U, Hanley DF, Sprengel R, Seeburg PH. 1999. GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 19:2037-50.
- Steven C, Lehnen N, Kight K, Ijiri S, Klenke U, Harris WA, Zohar Y. 2003. Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. *General and comparative endocrinology* 133:27-37.

- Terasawa E, Keen KL, Mogi K, Claude P. 1999. Pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in cultured LHRH neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. *Endocrinology* 140:1432-41.
- Terasawa E, Quanbeck CD, Schulz CA, Burich AJ, Luchansky LL, Claude P. 1993. A primary cell culture system of luteinizing hormone releasing hormone neurons derived from embryonic olfactory placode in the rhesus monkey. *Endocrinology* 133:2379-90.
- Tobet SA, Chickering TW, King JC, Stopa EG, Kim K, Kuo-Leblank V, Schwarting GA. 1996a. Expression of gamma-aminobutyric acid and gonadotropin-releasing hormone during neuronal migration through the olfactory system. *Endocrinology* 137:5415-20.
- Tobet SA, Hanna IK, Schwarting GA. 1996b. Migration of neurons containing gonadotropin releasing hormone (GnRH) in slices from embryonic nasal compartment and forebrain. *Brain Res Dev Brain Res* 97:287-92.
- Todman MG, Han SK, Herbison AE. 2005. Profiling neurotransmitter receptor expression in mouse gonadotropin-releasing hormone neurons using green fluorescent protein-promoter transgenics and microarrays. *Neuroscience* 132:703-12.
- Valverde F, Heredia M, Santacana M. 1993. Characterization of neuronal cell varieties migrating from the olfactory epithelium during prenatal development in the rat. Immunocytochemical study using antibodies against olfactory marker protein (OMP) and luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH). *Brain research Developmental brain research* 71:209-20.
- Valverde F, Santacana M, Heredia M. 1992. Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. *Neuroscience* 49:255-75.
- Verney C, el Amraoui A, Zecevic N. 1996. Comigration of tyrosine hydroxylase- and gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the nasal area of human embryos. *Brain Res Dev Brain Res* 97:251-9.
- Vincent AJ, West AK, Chuah MI. 2003. Morphological plasticity of olfactory ensheathing cells is regulated by cAMP and endothelin-1. *Glia* 41:393-403.
- Vosges M, Kah O, Hinfrey N, Chadili E, Le Page Y, Combarnous Y, Porcher JM, Brion F. 2012. 17alpha-Ethinylestradiol and nonylphenol affect the development of forebrain GnRH neurons through an estrogen receptors-dependent pathway. *Reproductive toxicology* 33:198-204.
- Vosges M, Le Page Y, Chung BC, Combarnous Y, Porcher JM, Kah O, Brion F. 2010. 17alpha-ethinylestradiol disrupts the ontogeny of the forebrain GnRH system and the expression of brain aromatase during early development of zebrafish. *Aquatic toxicology* 99:479-91.
- Whitlock KE, Westerfield M. 2000. The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development* 127:3645-53.
- Wierman ME, Kiseljak-Vassiliades K, Tobet S. 2010. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: Initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function. *Front Neuroendocrinol*.
- Wirsig-Wiechmann CR, Oka Y. 2002. The terminal nerve ganglion cells project to the olfactory mucosa in the dwarf gourami. *Neuroscience research* 44:337-41.
- Witkin JW, Paden CM, Silverman AJ. 1982. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology* 35:429-38.
- Wray S. 2002. Development of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Front Neuroendocrinol* 23:292-316.
- Wray S. 2010. From nose to brain: development of gonadotrophin-releasing hormone-1 neurones. *J Neuroendocrinol* 22:743-53.

- Wray S, Fueshko SM, Kusano K, Gainer H. 1996. GABAergic neurons in the embryonic olfactory pit/vomeronasal organ: maintenance of functional GABAergic synapses in olfactory explants. *Developmental biology* 180:631-45.
- Wray S, Grant P, Gainer H. 1989a. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:8132-6.
- Wray S, Nieburgs A, Elkabes S. 1989b. Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone-releasing hormone in the prenatal mouse: evidence for an embryonic origin in the olfactory placode. *Brain Res Dev Brain Res* 46:309-18.
- Xia L, Van Vugt D, Alston EJ, Luckhaus J, Ferin M. 1992. A surge of gonadotropin-releasing hormone accompanies the estradiol-induced gonadotropin surge in the rhesus monkey. *Endocrinology* 131:2812-20.
- Zheng LM, Jourdan F. 1988. Ultrastructure study of rat terminal nerve: organization of neural subsets and acetylcholinesterase cytochemistry. *Chemical Senses* 13:473-85.
- Zheng LM, Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M. 1992. Electron microscopic identification of luteinizing hormone-releasing hormone-immunoreactive neurons in the medial olfactory placode and basal forebrain of embryonic mice. *Neuroscience* 46:407-18.

ANNEXE

ANNEXE I: Liste des gènes et définitions en anglais des annotations

Cluster 1 de gènes sous-exprimés dans les cellules [GFP+] traitées pendant 48h avec 17nM d'éthinylestradiol

Catégorie	Annotation	Nom des gènes	Définition des annotations
mmu04115	p53 signaling pathway	CCND1 CDKN2A SIAH1B CYCS MDM2 MDM4 THBS1 SESN1	p53 activation is induced by a number of stress signals, including DNA damage, oxidative stress and activated oncogenes. The p53 protein is employed as a transcriptional activator of p53-regulated genes. This results in three major outputs; cell cycle arrest, cellular senescence or apoptosis. Other p53-regulated gene functions communicate with adjacent cells, repair the damaged DNA or set up positive and negative feedback loops that enhance or attenuate the functions of the p53 protein and integrate these stress responses with other signal transduction pathways
mmu04120	Ubiquitin mediated proteolysis	UBE2A SIAH1B KLHL9 UBR5 MDM2 HERC4 UBE2L3 UBE2B	Protein ubiquitination plays an important role in eukaryotic cellular processes. It mainly functions as a signal for 26S proteasome dependent protein degradation. The addition of ubiquitin to proteins being degraded is performed by a reaction cascade consisting of three enzymes, named E1 (ubiquitin activating enzyme), E2 (ubiquitin conjugating enzyme), and E3 (ubiquitin ligase). Each E3 has specificity to its substrate, or proteins to be targeted by ubiquitination. Many E3s are discovered in eukaryotes and they are classified into four types: HECT type, U-box type, single RING-finger type, and multi-subunit RING-finger type. Multi-subunit RING-finger E3s are exemplified by cullin-Rbx E3s and APC/C. They consist of a RING-finger-containing subunit (RBX1 or RBX2) that functions to bind E2s, a scaffold-like cullin molecule, adaptor proteins, and a target recognizing subunit that binds substrates.
mmu04520	Adherens junction	ACTB CSNK2A1 FYN PVRL3 CSNK2B MLLT4	Cell-cell adherens junctions (AJs), the most common type of intercellular adhesions, are important for maintaining tissue architecture and cell polarity and can limit cell movement and proliferation. At AJs, E-cadherin serves as an essential cell adhesion molecules (CAMs). The cytoplasmic tail binds beta-catenin, which in turn binds alpha-catenin. Alpha-catenin is associated with F-actin bundles directly and indirectly. The integrity of the cadherin-catenin complex is negatively regulated by phosphorylation of beta-catenin by receptor tyrosine kinases (RTKs) and cytoplasmic tyrosine kinases (Fer, Fyn, Yes, and Src), which leads to dissociation of the cadherin-catenin complex. Integrity of this complex is positively regulated by beta -catenin phosphorylation by casein kinase II, and dephosphorylation by protein tyrosine phosphatases. Changes in the phosphorylation state of beta-catenin affect cell-cell adhesion, cell migration and the level of signaling beta-catenin. Wnt signaling acts as a positive regulator of beta-catenin by inhibiting beta-catenin degradation, which stabilizes beta-catenin, and causes its accumulation. Cadherin may acts as a negative regulator of signaling beta-catenin as it binds beta-catenin at the cell surface and thereby sequesters it from the nucleus. Nectins also function as CAMs at AJs, but are more highly concentrated at AJs than E-cadherin. Nectins transduce signals through Cdc42 and Rac, which reorganize the actin cytoskeleton, regulate the formation of AJs, and strengthen cell-cell adhesion.

mmu04310	Wnt signaling pathway	TBL1XR1 CCND1 CSNK2A1 SIAH1B CSNK2B MAPK8 PPP2R5E APC	Wnt proteins are secreted morphogens that are required for basic developmental processes, such as cell-fate specification, progenitor-cell proliferation and the control of asymmetric cell division, in many different species and organs. There are at least three different Wnt pathways: the canonical pathway, the planar cell polarity (PCP) pathway and the Wnt/Ca ²⁺ pathway. In the canonical Wnt pathway, the major effect of Wnt ligand binding to its receptor is the stabilization of cytoplasmic beta-catenin through inhibition of the beta-catenin degradation complex. Beta-catenin is then free to enter the nucleus and activate Wnt-regulated genes through its interaction with TCF (T-cell factor) family transcription factors and concomitant recruitment of coactivators. Planar cell polarity (PCP) signaling leads to the activation of the small GTPases RHOA (RAS homologue gene-family member A) and RAC1, which activate the stress kinase JNK (Jun N-terminal kinase) and ROCK (RHO-associated coiled-coil-containing protein kinase 1) and leads to remodelling of the cytoskeleton and changes in cell adhesion and motility. WNT-Ca ²⁺ signalling is mediated through G proteins and phospholipases and leads to transient increases in cytoplasmic free calcium that subsequently activate the kinase PKC (protein kinase C) and CAMKII (calcium calmodulin mediated kinase II) and the phosphatase calcineurin.
mmu04510	Focal adhesion	ACTB PDPK1 CCND1 FYN PPP1R12 A MAPK8 COL2A1 THBS1 PIK3R1	Cell-matrix adhesions play essential roles in important biological processes including cell motility, cell proliferation, cell differentiation, regulation of gene expression and cell survival. At the cell-extracellular matrix contact points, specialized structures are formed and termed focal adhesions, where bundles of actin filaments are anchored to transmembrane receptors of the integrin family through a multi-molecular complex of junctional plaque proteins. Some of the constituents of focal adhesions participate in the structural link between membrane receptors and the actin cytoskeleton, while others are signalling molecules, including different protein kinases and phosphatases, their substrates, and various adapter proteins. Integrin signaling is dependent upon the non-receptor tyrosine kinase activities of the FAK and src proteins as well as the adaptor protein functions of FAK, src and Shc to initiate downstream signaling events. These signalling events culminate in reorganization of the actin cytoskeleton; a prerequisite for changes in cell shape and motility, and gene expression. Similar morphological alterations and modulation of gene expression are initiated by the binding of growth factors to their respective receptors, emphasizing the considerable crosstalk between adhesion- and growth factor-mediated signalling.
GO:0043281	Regulation of caspase activity	TRIAP1 CIB1 CYCS MDM2 GPI1 THBS1 UACA CDKN2D BAX CDKN2A	Any process that modulates the activity of a cysteine-type endopeptidase involved in apoptosis

GO:0007050	Cell cycle arrest	CDKN1B PTPN11 MDM2 SMC1A APC CYP27B1	A regulatory process that halts progression through the cell cycle during one of the normal phases (G1, S, G2, M).
GO:0006417	Regulation of translation	NCBP2 EIF4G1 RBM8A PAIP1 IREB2 PPP1R15B PSMG2M DM4 SESN1 THBS1 CCND1 CDKN2D CDKN2A	Any process that modulates the frequency, rate or extent of the chemical reactions and pathways resulting in the formation of proteins by the translation of mRNA.
GO:0010608	Posttranscriptional regulation of gene expression	NCBP2 EIF4G1 CDKN2A RBM8A PAIP1 IREB2 PPP1R15B	Any process that modulates the frequency, rate or extent of gene expression after the production of an RNA transcript
GO:0006984	ER-nuclear signaling pathway	CCND1 DERL1 ERO1L PPP1R15B	Any series of molecular signals that conveys information from the endoplasmic reticulum to the nucleus, usually resulting in a change in transcriptional regulation
GO:0035097	Histone methyltransferase complex	TAF7 INO80C TAF1 LAS1L MCRS1 ACTB SETD1A	A multimeric complex that is able to catalyze the addition of methyl groups to histone proteins.

GO:0034708	Methyltransferase complex	INO80C TAF7 TAF1 LAS1L MCRS1 ACTB SETD1A	A protein complex that possesses methyltransferase activity
GO:0071339	MLL1 complex	INO80C TAF7 TAF1 LAS1L MCRS1	A protein complex that can methylate lysine-4 of histone H3. MLL1/MLL is the catalytic methyltransferase subunit, and the complex also contains the core components ASH2L, HCFC1/HCF1 WDR5 and RBBP5.

Cluster 2 de gènes sur-exprimés dans les cellules [GFP+] traitées pendant 48h avec 17nM d'éthinylestradiol

Catégorie	Annotation	Nom des gènes	Définition de l'annotation
mmu04120	Ubiquitin mediated proteolysis	ANAPC2 UBE2D2 CUL4A UBE2K UBA1 PIAS3 UBE2G2 SAE1 TCEB1 UBE2E2 UBE2R2	Protein ubiquitination plays an important role in eukaryotic cellular processes. It mainly functions as a signal for 26S proteasome dependent protein degradation. The addition of ubiquitin to proteins being degraded is performed by a reaction cascade consisting of three enzymes, named E1 (ubiquitin activating enzyme), E2 (ubiquitin conjugating enzyme), and E3 (ubiquitin ligase). Each E3 has specificity to its substrate, or proteins to be targeted by ubiquitination. Many E3s are discovered in eukaryotes and they are classified into four types: HECT type, U-box type, single RING-finger type, and multi-subunit RING-finger type. Multi-subunit RING-finger E3s are exemplified by cullin-Rbx E3s and APC/C. They consist of a RING-finger-containing subunit (RBX1 or RBX2) that functions to bind E2s, a scaffold-like cullin molecule, adaptor proteins, and a target recognizing subunit that binds substrates.
mmu03010	Ribosome	RPL13 RPLP0 RPL8 UBC RPLP2 RPS2 KPNA2	Translation
mmu03018	RNA degradation	EXOSC9 CNOT8 WDR61 CNOT1	The correct processing, quality control and turnover of cellular RNA molecules are critical to many aspects in the expression of genetic information. In eukaryotes, two major pathways of mRNA decay exist and both pathways are initiated by poly(A) shortening of the mRNA. In the 5' to 3' pathway, this is followed by decapping which then permits the 5' to 3' exonucleolytic degradation of transcripts. In the 3' to 5' pathway, the exosome, a large multisubunit complex, plays a key role. The exosome exists in archaeal cells, too. In bacteria, endoribonuclease E, a key enzyme involved in RNA decay and processing, organizes a protein complex called degradosome. RNase E or R interacts with the phosphate-dependent exoribonuclease polynucleotide phosphorylase, DEAD-box helicases, and additional factors in the RNA-degrading complex.

GO:0004842	ubiquitin-protein ligase activity	MIB1 UBE2D2 UBE2K UBE2G2 UBR2 UBR1 CBLL1 FEM1A RBBP6 UBE2E2 UBE2R2	Catalysis of the reaction: ATP + ubiquitin + protein lysine = AMP + diphosphate + protein N-ubiquityllysine.
GO:0022613	ribonucleoprotein complex biogenesis	KRR1 EXOSC9 SURF6 RPLP0 DICER1 NPM1 FTSJ1 FTSJ3	A cellular process that results in the biosynthesis of constituent macromolecules, assembly, and arrangement of constituent parts of a complex containing RNA and proteins. Includes the biosynthesis of the constituent RNA and protein molecules, and those macromolecular modifications that are involved in synthesis or assembly of the ribonucleoprotein complex.
GO:0042254	ribosome biogenesis	KRR1 EXOSC9 SURF6 RPLP0 NPM1 FTSJ1 FTSJ3	A cellular process that results in the biosynthesis of constituent macromolecules, assembly, and arrangement of constituent parts of ribosome subunits; includes transport to the sites of protein synthesis
GO:0007017	microtubule-based process	SS18 KIF5B TUBA3A CNTROB NPM1 KIF20B ACTR10	Any cellular process that depends upon or alters the microtubule cytoskeleton, that part of the cytoskeleton comprising microtubules and their associated proteins.

GO:0022402	cell cycle process	ANAPC2 TSG101 USP9X CETN2 UBR2 EHMT2 ITGB1 RASSF1 NPM1 TBRG1 CNTROB KIF20B ERN2 NUP37 TXNL4A	A cellular process that is involved in the progression of biochemical and morphological phases and events that occur in a cell during successive cell replication or nuclear replication events
GO:0007049	cell cycle	ANAPC2 TSG101 USP9X CETN2 UBR2 CDC5L EHMT2 ITGB1 MCM8 RASSF1 CNTROB NPM1 TBRG1 KIF20B ERN2 TLK1 NUP37 TXNL4A CALM1	The progression of biochemical and morphological phases and events that occur in a cell during successive cell replication or nuclear replication events. Canonically, the cell cycle comprises the replication and segregation of genetic material followed by the division of the cell, but in endocycles or syncytial cells nuclear replication or nuclear division may not be followed by cell division

Cluster 1 de gènes sous-exprimés dans les cellules [GFP+] traitées pendant 10jours avec 100nM d'oestradiol

Catégorie	Annotation	Définition de l'annotation
GO:0000278	Mitotic cell cycle	Progression through the phases of the mitotic cell cycle, the most common eukaryotic cell cycle, which canonically comprises four successive phases called G1, S, G2, and M and includes replication of the genome and the subsequent segregation of chromosomes into daughter cells. In some variant cell cycles nuclear replication or nuclear division may not be followed by cell division, or G1 and G2 phases may be absent
GO:0051276	Chromosome organization	A process that is carried out at the cellular level that results in the assembly, arrangement of constituent parts, or disassembly of chromosomes, structures composed of a very long molecule of DNA and associated proteins that carries hereditary information.
GO:0006397	mRNA processing	Any process involved in the conversion of a primary mRNA transcript into one or more mature mRNA(s) prior to translation into polypeptide
GO:0019941	Modification dependent protein catabolic process	The chemical reactions and pathways resulting in the breakdown of a protein or peptide by hydrolysis of its peptide bonds, initiated by the covalent modification of the target protein.
GO:0019941	Cellular macromolecular complex assembly	The aggregation, arrangement and bonding together of a set of macromolecules to form a complex, carried out at the cellular level
GO:0044085	Cellular component biogenesis	The aggregation, arrangement and bonding together of a cellular component
GO:0051603	Proteolysis involved in cellular protein catabolic process	The hydrolysis of a peptide bond or bonds within a protein as part of the chemical reactions and pathways resulting in the breakdown of a protein by individual cells
GO:0070507	Regulation of microtubule cytoskeleton organization	Any process that modulates the frequency, rate or extent of the formation, arrangement of constituent parts, or disassembly of cytoskeletal structures comprising microtubules and their associated proteins.
GO:0031109	Microtubule polymerization or depolymerization	Assembly or disassembly of microtubules by the addition or removal of tubulin heterodimers from a microtubule
GO:0032886	Regulation of microtubule-based process	Any process that modulates the frequency, rate or extent of any cellular process that depends upon or alters the microtubule cytoskeleton

Cluster 2 de gènes sur-exprimés chez les cellules [GFP+] traitées pendant 10jours avec 100nM d'oestradiol

Catégorie	Annotation	Définition de l'annotation
Go:0034470	Non coding RNA processing	The chemical reactions and pathways involving non-coding RNA transcripts (ncRNAs).
Go:0042254	Ribosome biogenesis	A cellular process that results in the biosynthesis of constituent macromolecules, assembly, and arrangement of constituent parts of ribosome subunits; includes transport to the sites of protein synthesis.
Go:0006519	Cellular amino acid and derivative metabolic process	The chemical reactions and pathways involving amino acids, carboxylic acids containing one or more amino groups, as carried out by individual cells.
GO:0006412	Translation	The cellular metabolic process in which a protein is formed, using the sequence of a mature mRNA molecule to specify the sequence of amino acids in a polypeptide chain. Translation is mediated by the ribosome, and begins with the formation of a ternary complex between aminoacylated initiator methionine tRNA, GTP, and initiation factor 2, which subsequently associates with the small subunit of the ribosome and an mRNA. Translation ends with the release of a polypeptide chain from the ribosome.
GO:0043038	Amino acid activation	The modification of an amino acid to an active form, for incorporation into a peptide, protein or other macromolecule
Go:0006457	Protein folding	The process of assisting in the covalent and noncovalent assembly of single chain polypeptides or multisubunit complexes into the correct tertiary structure
Go:0005198	Structural molecule activity	The action of a molecule that contributes to the structural integrity of a complex or assembly within or outside a cell

Caractérisation des cellules gliales olfactives associées aux neurones à GnRH-I : Rôle dans le développement de ces neurones

Résumé

Chez le mammifère la fonction de reproduction est sous le contrôle des neurones hypothalamiques à GnRH-I. Au cours du développement embryonnaire ces neurones migrent de la fosse nasale vers le cerveau. De nombreuses études s'intéressent aux facteurs impliqués dans leur migration, mais l'influence de leur environnement cellulaire est très peu étudiée. Nous avons émis l'hypothèse que les neurones à GnRH-I d'origine extra-cérébrale possèdent un environnement gliale nécessaire à leur migration, connaissant le rôle de ces cellules dans l'ontogenèse neuronale du cerveau. Nos résultats montrent que 1) les neurones à GnRH-I sont associés à des cellules gliales au cours de leurs migrations nasale et télencéphalique 2) ces cellules gliales sont des progéniteurs des cellules gliales olfactives engainantes qui se différencient dans les régions rostrales au cours de la migration neuronale. 3) ces cellules expriment des gènes codant pour des facteurs impliqués dans la migration de ces neurones. 4) le transcriptome de ces cellules gliales est perturbé en présence d'un perturbateur endocrinien œstrogène-mimétique, et touche des familles de gènes impliquées dans les molécules d'adhésions cellulaires nécessaires à la migration et à la régulation de l'activité des neurones à GnRH-I.

Mots clefs : neurones à GnRH-I, cellules gliales olfactives engainantes, migration, perturbateur endocrinien

Abstract

GnRH-I cells control reproduction functions in mammals. These cells are extra cerebral since they come from the nasal pit and migrate to the forebrain during embryonic development. Numerous studies have described the influence of different molecules on the migration of GnRH-1 neurons, however, the role of microenvironment cells remains poorly understood. Considering the role of glial cells in the forebrain's neuronal migration, we had hypothesized that extra-cerebral GnRH-I neurons possess a glial environment necessary for their migration from the nose to the brain. Our results demonstrated that 1) GnRH-I neurons are associated with glial cells during their migration in the nasal septum and forebrain 2) These glial cells are progenitors of olfactory ensheathing cells, and differentiated within the rostral regions during neuronal migration. 3) These cells express genes encoding factors involved in GnRH-I neurons migration 4) Glial cells transcriptome are disrupted with estrogen-mimicking endocrine disruptor, and affects gene families involved in cell adhesion molecules necessary for migration and activity regulation of GnRH-I neurons

Keywords : GnRH-I neurons, glial olfactory ensheathing cells, migration, endocrine disruptor