HABILITATION A DIRIGER DES RECHERCHES

Date de la soutenance : **28 novembre 2022**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Monsieur CHEDOTAL Alain**

Titre de la thèse : *« Développement et évolution des système commissuraux »*

Résumé

Résumé du parcours scientifique

J'ai obtenu un poste de CR2 INSERM en Octobre 1997 et ai alors rejoint l'Unité 106 (Dir. Constantino Sotelo) à l'hôpital de la Salpêtrière à Paris. J'ai commencé à monter un groupe indépendant en 2000, ai été promu CR1 en Mai 2001 puis DR2 en Octobre 2001. En Novembre 2002, peu avant la fermeture de l'Unité 106, j'ai transféré, mon équipe au laboratoire CNRS de Neurobiologie des Processus Adaptatifs (dir. Jean Mariani). J'ai été promu DR1 en Janvier 2007. J'ai créé en 2008 une mono-équipe INSERM qui a été intégrée à l'unité 592 dirigée par le Pr. J. Sahel en Mars 2008, après notre installation à l'Institut de la Vision.

Introduction

Tout système nerveux est constitué d'un ensemble de cellules excitables les neurones qui sont capables de recevoir des informations qu'ils traitent et transmettent par l'intermédiaire de leurs axones. Le réseau de connexions axonales est complexe et très précis, et sa mise en place ordonnée pendant le développement embryonnaire et postnatal est indispensable au bon fonctionnement cérébral. Depuis des années, les neurobiologistes tentent de découvrir les mécanismes impliqués dans la mise en place des connexions axonales. Ce problème est extrêmement complexe, en raison du nombre (près de 80 milliards chez l'homme) et de la grande diversité des neurones et de leurs projections. Des remaniements des connexions neuronales s'observent tout au long de la vie tant au cours de processus normaux (mémoire, apprentissage…) que dans des situations pathologiques (lésions cérébrales, maladies neurodégénératives). Depuis le début, mes travaux de recherches ont porté sur l'étude du développement des connexions axonales dans le système nerveux central (SNC) des vertébrés. J'ai commencé au tout début des années 1990 qui ont été des années charnières dans

ce domaine. En effet, jusqu'alors la problématique du guidage axonal était essentiellement abordée d'un point de vue descriptif et faisait appel à des techniques d'embryologie expérimentales (greffes, ablation etc…). Des approches biochimiques avaient cependant conduit à la purification de plusieurs protéines de la matrice extracellulaire ou membranaires, principalement des immunoglobulines, qui avaient la capacité d'influencer la croissance neuritique in vitro[1]. Le développement de la biologie moléculaire et de la génétique allait permettre en quelques années de révolutionner ce domaine de recherche et d'identifier de très nombreuses molécules clés telles que les sémaphorines (1993), la nétrine-1 (1994) les éphrines/Eph (1995) et les Slits (1999). Ces découvertes ont permis de proposer un modèle de développement des connexions neuronales selon lequel les axones sont guidés par des protéines membranaires ou diffusibles, qui peuvent stimuler la croissance axonale ou au contraire l'inhiber[2]. Les molécules de guidage axonal participent à d'autres processus comme la migration neuronale, la myélinisation, l'inhibition de la régénération axonale contribuant ainsi à élargir les domaines d'applications de ces découvertes. Enfin, on sait aussi que les molécules de guidage axonal sont présentes dans tous les organes pendant le développement mais aussi chez l'adulte et qu'elles pourraient être impliquées dans de nombreuses pathologies, notamment les cancers[3].

Un exemple de la diversité de leur fonction peut être apporté par une de nos études qui a montré que la protéine Slit2, et ses récepteurs, Robo1 et Robo2, favorisent la croissance vasculaire normale et pathologique en stimulant la migration des cellules endothéliales rétiniennes[4]. Les maladies vasoprolifératives oculaires sont les principales sources de cécité dans le monde et touchent des millions de personnes. Ainsi, une croissance anormale des vaisseaux sanguins est observée dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA exsudative), la rétinopathie diabétique et la rétinopathie de la prématurité. L'utilisation de modèles murins nous a permis de montrer que l'inactivation de l'expression de Slit2 ou de Robo1/Robo2 inhibe le développement de la vascularisation rétinienne. De plus, l'inhibition de Slit2 permet de bloquer le développement de néo-vaisseaux dans un modèle de rétinopathie de la prématurité. Ce travail suggère que des molécules ciblant le complexe Slit2/Robo pourraient permettre de bloquer la croissance anormale des vaisseaux, dans les pathologies oculaires mais aussi les cancers.

1. Identification et fonction de nouveaux récepteurs de molécules de guidage axonal

Une grande partie des travaux que j'ai menés depuis mon recrutement à l'INSERM ont permis d'identifier plusieurs couples ligand/récepteur et de mieux comprendre le mode d'action des molécules de guidage axonal. Ainsi, en collaboration avec les laboratoires des Professeurs Marc Tessier- Lavigne et Corey Goodman, nous avons pu isoler une nouvelle forme de neuropiline, la neuropiline-2, dont au moins 6 isoformes sont produites par épissage alternatif, et qui sont des récepteurs à haute affinité des sémaphorines sécrétées[5]. L'analyse des souris déficientes en neuropiline-2 nous a permis de démontrer le rôle majeur de ce récepteur dans le développement de nombreux faisceaux d'axones, notamment hippocampiques, et dans l'action répulsive de plusieurs sémaphorines sécrétées (une collaboration avec le Dr E. Soriano, Barcelone, Espagne)[6,7]. En collaboration avec Geneviève Rougon et Valérie Castellani (IBDM, Marseille) nous avons montré que la molécule L1-CAM, une immunoglobuline impliquée dans de nombreux processus biologiques est un élément essentiel du récepteur de la Sémaphorine Sema3A et un corécepteur de la neuropiline-1 (résultat étendu depuis aux autres neuropilines et à d'autres CAMs)[8]. Nous avons pu montrer, en collaboration avec le groupe de Paolo Comoglio, que les sémaphorines membranaires de vertébrés ont aussi pour récepteurs des Plexines[9]. En outre, certaines Plexines sont les co-récepteurs des

neuropilines, transduisant le signal sémaphorine dans les axones. Ces travaux ont donc permis de caractériser de nouveaux de récepteurs et de co-récepteurs des sémaphorines.

RGM (repulsive guidance molecule) est une molécule, purifiée en 2002 à partir du toit optique de poulet[10]. Comme les éphrines A, RGM est glypiée et fortement exprimée par les cellules du toit optique postérieur et faiblement dans le toit optique antérieur. RGM inhibe sélectivement la croissance des axones des cellules ganglionnaires provenant de la rétine postérieure. Des travaux réalisés par le groupe du Dr Steve Strittmatter (Yale, USA) en collaboration avec notre équipe ont permis de montrer que le récepteur de RGM est une molécule proche de DCC appelée néogenine[11]. La surexpression de la néogenine dans les SNC de poulet embryonnaire provoque une forte élévation de la mort cellulaire apoptotique[12]. Avec l'équipe du Dr Mehlen, nous avons montré que la perte de RGM stimule la mort cellulaire. Cet effet pro-apoptotique est dépendant de la présence de néogenine, requiert un clivage de son domaine intracellulaire et l'activation de la voie des caspases. Ces résultats montrent que la néogenine est un récepteur à dépendance. La manipulation de l'expression de RGM dans le toit optique du poulet perturbe le développement des projections rétinotectales.

2. Développement, Fonction et Evolution des neurones commissuraux

Dans la plupart des espèces animales, le système nerveux central (SNC) est organisé de manière symétrique, avec un côté droit et un côté gauche, un avant et un arrière et il contient des neurones commissuraux, qui projettent leur axone du côté opposé, à travers la ligne médiane[13]. Le rôle joué par ces projections croisées dans la physiologie du SNC est encore très largement incompris bien que l'on sache que des anomalies de développement des commissures puissent être la cause de maladies neurologiques congénitales (notamment les mouvements en miroirs). Chez les vertébrés, le nombre et la densité des axones commissuraux sont particulièrement élevés dans le tronc cérébral et la moelle épinière[14].

2.1 Robo3 un récepteur clé pour les neurones commissuraux

Des recherches génétiques menées initialement chez la mouche Drosophile et le ver *C. elegans* ont conduit à la découverte de plusieurs familles de molécules régulant le comportement des axones vis-à-vis de la ligne médiane[15]. Les cellules de la ligne médiane sécrètent les protéines Slits qui en se fixant sur les récepteurs Roundabout (Robo), contraignent les axones à s'éloigner. Chez les mammifères, on connaît quatre récepteurs Robo (Robo1, Robo2, Robo3/Rig-1 et Robo4) et trois protéines Slits (Slit1-Slit3)[16]. Des études faisant notamment appel à la culture cellulaire ont montré que l'activité répulsive des Slits pour les axones exprimant Robo est conservée au cours de l'évolution. L'analyse de l'organisation des connexions axonales, notamment par notre équipe, a montré que chez des souris knokout (KO), déficientes en Robos et Slits de nombreux axones ne croisent plus la ligne médiane, ou alors anormalement. Ainsi, dans le KO de Robo3, la plupart des axones commissuraux de la moelle épinière et du tronc cérébral demeurent ipsilatéraux et n'arrivent pas à croiser[17,18]. Le récepteur Robo3 est particulièrement intéressant car chez les vertébrés il est exprimé exclusivement par les neurones commissuraux du tronc cérébral et de la moelle épinière. Cette expression est transitoire et s'éteint une fois que les axones ont traversé la ligne médiane ventrale (la plaque du plancher). Nous avons réalisé des études génétiques chez la souris pour essayer de comprendre le mécanisme d'action de Robo3 et expliquer l'incapacité des axones commissuraux à traverser la ligne médiane sans ce récepteur[19]. Nous avons principalement étudié plusieurs populations de neurones du tronc cérébral qui envoient des axones dans le cervelet, d'où leur nom de neurones précérébelleux. Tous ces

neurones projettent leurs axones à travers la plaque du plancher. En outre, pendant le développement, le corps cellulaire de certains neurones précérébelleux (le noyau réticulaire latéral et le noyau cuneatus externe) va aussi migrer à travers la ligne médiane alors que les neurones de l'olive inférieure et du pont arrêtent de migrer en arrivant à la plaque du plancher sans la traverser. Nos données initiales suggéraient que Robo3 agit comme un antagoniste de l'activité répulsive des Slits en inactivant les récepteurs Robo1/2, permettant ainsi aux axones commissuraux de s'approcher de la ligne médiane[18]. Chez le KO Robo3, l'absence du récepteur entrainerait une activation prématurée du signal répulsif Slit/Robo, empêchant ainsi les axones de traverser la ligne médiane. Toutefois, nous avons conduit ultérieurement une analyse phylogénétique comparée des récepteurs Robo3 des vertébrés qui a mis en évidence une sélection positive de ce récepteur chez les mammifères qui l'a rendu unique dans ce taxon[20]. Ainsi, contrairement à tous les autres récepteurs Robo de tous les Bilatériens, le récepteur Robo3 des mammifères ne fixe pas les ligands Slits, probablement en raison de la perte d'acides aminés requis pour leur liaison. De plus, chez les mammifères uniquement, Robo3 est activé par la nétrine-1, via le récepteur DCC et les kinases de type Src. Selon notre modèle actuel, Robo3 stimule la croissance en direction ventrale des axones et neurones commissuraux. Nous pensons que cette modification de la fonction de Robo3 a joué un rôle important dans la mise en place de circuits commissuraux spécifiques chez les vertébrés.

Chez l'homme, des mutations du gène ROBO3 sont à l'origine d'une maladie neurologique rare, le syndrome HGPPS, qui associe scoliose sévère et strabisme[21]. Nous avons montré en collaboration avec le groupe du Dr G. Fortin (CNRS, Gif/Yvette), que les neurones respiratoires du tronc cérébral situés dans le noyau Pré-Bötzinger, contiennent des interneurones commissuraux qui connectent les noyaux droit et gauche et synchronisent leur activité spontanée et rythmique. Chez les souris mutantes pour Robo3, les deux noyaux sont découplés et les souris meurent juste après la naissance d'anomalies respiratoires[22]. Nous avons souhaité utiliser le gène *Robo3* comme outil permettant de manipuler génétiquement les projections commissurales et ainsi tester leur fonction. En effet, nos données indiquaient qu'en l'absence de Robo3, les axones commissuraux se connectaient aux mêmes neurones cibles, mais du mauvais côté du SNC. Pour valider cette approche nous avons, dans une première étude, croisé les KO Robo3lox avec des souris transgéniques exprimant la recombinase Cre dans des sous populations des neurones commissuraux : neurones auditifs projetant du noyau cochléaire ventral antérieur (aVCN) vers le noyau médian du corps trapézoïde (MNTB), neurones précérébelleux de l'olive inférieure et interneurones du noyau abducens[23]. Nous avons montré que les lignées obtenues présentent des défauts sélectifs de certaines commissures dans les systèmes moteur, sensoriel et sensori-moteur, se traduisant par de sévères déficits fonctionnels, notamment moteurs et auditifs. Dans les études suivantes, nous avons étudiés les conséquences fonctionnelles du recâblage ipsilatéral des axones commissuraux. Ainsi, dans le système auditif, les axones de l'aVCN forment sur les neurones du MNTB de très larges synapses appelées Calices de Held[24]. A maturité, un seul calice est présent sur chaque neurone du MNTB. En l'absence de Robo3, les neurones du MNTB sont anormalement multi-innervés et la transmission synaptique est perturbée. De même, l'inactivation ciblée de Robo3 dans les axones de l'olive inférieure conduit ces derniers à innerver des Cellules de Purkinje situées du côté ipsilatéral du cervelet ce qui perturbe l'intégration des courants synaptiques et l'apprentissage moteur[25].

Nous avons aussi appliqué cette stratégie à l'étude du système somato-sensoriel et avons montré que le recâblage ipsilatéral partiel des projections trigémino-thalamiques entraine le développement dans le cortex de deux cartes somato-sensorielles imbriquées traitant les informations en provenance des

vibrisses controlatérales ou ipsilatérales[26]. Nous cherchons actuellement à comprendre comment les deux cartes se mettent en place et pourquoi elles sont ségrégées. Les souris mutantes du récepteur Robo3 représentent d'excellents modèles d'étude du syndrome HGPPS, de la fonction des projections commissurales et de la plasticité cérébrale.

2.2 Rôle de la Nétrine-1 et de ses récepteurs

A la fin du XIXème siècle, Santiago Ramón y Cajal, avait proposé que les axones commissuraux sont attirés ventralement par des molécules attractives émises par les cellules de plaque du plancher situées au niveau de la ligne médiane ventrale du tronc cérébral et de la moelle épinière[27].

Ce n'est pourtant qu'en 1994, que fut isolée la nétrine-1, une protéine sécrétée, exprimée au niveau de la plaque du plancher et capable dans divers modèles in vitro d'attirer à distance les axones commissuraux[28]. En outre, l'inactivation du gène de la Nétrine-1 chez la souris s'accompagne d'un développement anormal des axones commissuraux qui n'arrivent plus à atteindre la plaque du plancher. Ces résultats ont amené à proposer que les axones commissuraux remontent un gradient ventro-dorsal de nétrine-1 diffusant depuis la plaque du plancher. L'activité chimioattractive de la nétrine-1 mettrait en jeu un récepteur appelé DCC (pour « deleted in colorectal cancer »), alors qu'elle peut aussi avoir une action répulsive via les récepteurs UNC5. Depuis une quinzaine d'année, j'étudie le rôle de la nétrine-1 et de ses récepteurs, notamment en collaboration avec le groupe du Dr Patrick Mehlen (CNRS, Lyon). Son équipe a montré que DCC est un récepteur à dépendance qui induit la mort cellulaire en l'absence de nétrine-1[29]. Nous avons employé une technique de culture de neurones commissuraux de la moelle épinière embryonnaire et montré que leur survie était dépendante de l'ajout de nétrine-1. Nous avons aussi montré en utilisant des neurones d'embryons *Dcc*$^{-/-}$, que l'effet de la nétrine-1 est médié par Dcc[30]. Enfin, ces résultats ont été confirmé in vivo en employant l'électroporation dans le tube neural de poulet (en particulier de ShRNA dirigés contre la nétrine-1, et des formes mutées de DCC). Nous avons aussi identifié A2b, un récepteur de l'adénosine à sept domaines transmembranaires, comme un élément essentiel de la voie de signalisation de la nétrine dans les cônes de croissance, via son rôle sur la modulation de la concentration intracellulaire d'AMPc[31].

Un travail récent nous a permis de remettre en cause l'activité chimio-attractive de la netrine-1 en utilisant des approches génétiques pour bloquer la production de nétrine-1 par la plaque du plancher chez la souris[32]. De manière inattendue, les axones commissuraux se développent normalement, et traversent la plaque du plancher. Nous avons découvert que la nétrine-1 est également sécrétée à la surface du cerveau par des précurseurs neuronaux et que cette source de nétrine-1 est indispensable à la croissance ventrale des axones commissuraux. La nétrine-1 semble donc agir de manière très locale et non diffusible en assurant l'ancrage des axones commissuraux dans des domaines bien précis du cerveau embryonnaire. Ces travaux remettent donc en question le modèle classiquement admis de gradient de diffusion à longue distance de molécules de guidage axonal. Il conduit aussi à s'interroger sur la véritable fonction et mécanisme d'action de la nétrine-1 qui a depuis été impliquée dans de nombreuses pathologies telle que le cancer, le diabète ou l'arthrite inflammatoire. Une collaboration avec le Dr Emmanuel Roze (Institut du Cerveau, Paris) nous a permis de montrer que certains patients souffrant de mouvements en miroir sont porteurs de mutations du gène *Ntn1*, comme cela avait été déjà montré pour des mutations de *DCC*[33].

Enfin, nous avons réalisé des études phylogénétiques et de synténie des gènes de guidage axonal, qui ont révélé que le gène *Dcc* a été perdu dans deux ordres d'oiseaux, les galliformes et les passériformes

sans que cela ne se traduise par des altérations de l'organisation des projections commissurales[34]. Ces résultats, ainsi que ceux sur Robo3, soulignent la remarquable plasticité des mécanismes du guidage axonal et soulignent leur grande diversification au cours de l'évolution, contrairement à ce que postulent les modèles actuels.

Le récepteur Deleted in Colorectal Carcinoma (Dcc) est aussi essentiel au développement du nerf optique. Dcc s'exprime aussi dans l'œil postnatal mais sa fonction y restait inconnue car les KOs classiques de Dcc meurent à la naissance. Pour contourner ce problème, nous avons généré un mutant Dcc spécifique à l'œil. Pour étudier l'organisation de la rétine et des projections visuelles chez ces souris, nous avons mis au point EyeDISCO, un nouveau protocole de transparisation qui permet l'imagerie 3D des yeux intacts et des voies visuelles dans le cerveau entier. En l'absence de Dcc, certains axones des cellules ganglionnaires (CGs) restent bloqués au niveau du disque optique, tandis que d'autres perforent la rétine, séparant les photorécepteurs de l'épithélium pigmentaire. Certains axones visuels atteignent le cerveau, mais leurs projections sont anormales. Les rétines déficientes en Dcc présentent une mort postnatale massive de CGs et des photorécepteurs. Ainsi, le récepteur DCC est essentiel au développement de la rétine mais aussi à son maintien.

Nous avons récemment débuté un nouveau projet de recherche qui vise à étudier l'évolution du système visuel. Les axones des cellules ganglionnaires situées dans la moitié latérale ou la moitié médiane de chaque rétine se séparent au niveau du chiasma optique. Ainsi, de chaque côté du cerveau, les centres visuels sont binoculaires et reçoivent des informations provenant des deux yeux. La comparaison des 2 images permet au cerveau de voir en 3D. Cette organisation bilatérale des projections visuelles est présente chez les tétrapodes : mammifères, oiseaux, reptiles et amphibiens. En revanche, on pensait que chez les poissons, les yeux se projetaient uniquement dans du côté opposé du cerveau. En collaboration avec l'équipe du Dr Del Bene et des chercheurs Australiens, Américains et Espagnols nous avons utilisé la microscopie 3D couplée à la transparisation pour comparer l'organisation des voies visuelles des poissons téléostéens et des poissons anciens ou « reliques », comme les lépisostés ou le dipneuste. Nous avons découvert que les poissons anciens ont des projections visuelles bilatérales comme les tétrapodes et que seuls les téléostéens ont des projections visuelles n'innervant que le côté opposé du cerveau. Ceci démontre qu'une organisation bilatérale/binoculaire des voies visuelles existait déjà chez les poissons, bien avant la sortie des eaux et qu'elle a disparu chez les téléostéens. Nous avons également montré que les mécanismes moléculaires qui contrôlent la mise en place des projections visuelles bilatérales diffèrent entre les tétrapodes et les poissons anciens.

3. Rôle des Sémaphorines dans la migration des neurones granulaires du cervelet

Les neurones granulaires du cervelet (ou « grains ») représentent près de la moitié des neurones du cerveau et leur développement est très particulier[35]. En effet, les progéniteurs des grains sont générés dans les lèvres rhombiques qui bordent le toit du 4ème ventricule cérébral et colonisent la surface du cervelet pour former la couche des grains externe (ou EGL, pour *External Granular Layer*). Chez la souris, ces précurseurs reprennent leur prolifération, dans la partie superficielle de l'EGL, pendant les deux premières semaines post-natales, avant de sortir définitivement du cycle cellulaire. Les grains post-mitotiques se différencient dans l'EGL profonde, étendent des prolongements bipolaires (les futures fibres parallèles) parallèlement à la surface du cervelet, et migrent tangentiellement à celle-ci. Ils émettent ensuite un prolongement perpendiculaire aux premiers et migrent le long de la glie radiaire jusqu'à la couche des grains interne. Les grains constituent donc un modèle cellulaire de choix pour l'étude de la balance prolifération-différenciation et des modes de migrations tangentielle

et radiaire. En outre, une dérégulation de ces processus est à l'origine du médulloblastome, un des cancers les plus fréquents chez l'enfant. Mon équipe a montré que les premières étapes de la migration des cellulaires granulaires sont contrôlées par les sémaphorines, une large famille de glycoprotéines extracellulaires, membranaire ou sécrétées, impliquées dans le guidage axonal chez les invertébrés et les vertébrés.

Nous avons tout d'abord montré que dans le cervelet postnatal, la sémaphorine transmembranaire Sema6A est spécifiquement exprimée dans la couche granulaire externe (EGL), par les grains post-mitotiques en phase de migration tangentielle. L'étude du cervelet des souris déficientes pour Sema6A couplée à la vidéo-microscopie nous avait permis de montrer que Sema6A contrôle l'initiation de la migration tangentielle, probablement via une modulation de la translocation nucléaire[36]. Nous nous sommes alors intéressés à la plexine-A2, un des deux récepteurs connus de la Sema6A, et montré que la plexine-A2 est également exprimée par les cellules granulaires en migration tangentielle mais aussi radiaire[37,38]. Des anomalies de migration des grains similaires à celles observées chez les KO Sema6A sont présentes dans le cervelet des souris KO plexine-A2. En l'absence de plexine-A2, la translocation du corps cellulaire des grains est altérée pendant la migration tangentielle en raison d'un découplage du noyau et du centrosome. Ces données mettent en évidence un nouveau rôle des sémaphorines, dans la migration neuronale, via une modulation du couplage noyau- centrosome.

Par ailleurs, nous avons montré qu'une autre Plexine, la Plexine-B2 (dont les ligands sont inconnus) est fortement exprimée dans les zones de prolifération neuronale, en particulier dans la partie superficielle de l'EGL et qu'elle joue un rôle essentiel dans le contrôle de la balance entre prolifération et différenciation cellulaire[39,40]. Ces travaux démontrent que les plexines et les sémaphorines ne sont pas seulement impliquées dans la croissance axonale.

4. Molécules de guidage axonal et myélinisation

Les oligodendrocytes sont les cellules dont les prolongements forment la gaine de myéline qui entoure les axones du système nerveux central et assure ainsi la conduction saltatoire et rapide des potentiels d'action.

Nous avons montré que chez les rongeurs, au cours du développement post-natal, l'expression de deux sémaphorines transmembranaires, sémaphorine Sema4D/CD100 et Sema6A est restreinte aux oligodendrocytes[41,42] J'ai dirigé des travaux visant à comprendre le rôle de ces sémaphorines dans la myélinisation, et leur implication éventuelle dans les pathologies démyélinisantes. Ce projet a été réalisé en collaboration avec le groupe du Pr. C. Lubetzki (ICM, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière) et le Dr Sha Mi dans la société BiogenIdec (Cambridge, USA), société qui a pris en charge la valorisation des résultats (un brevet commun a été déposé).

Nos expériences de culture cellulaire indiquent que Sema4D est inhibitrice pour les axones de plusieurs catégories de neurones (DRG, grains du cervelet). De plus, l'expression de la Séma4D augmente rapidement et transitoirement dans les oligodendrocytes qui sont situés à proximité d'une lésion de la moelle épinière. Ce dernier résultat montre que, tout comme les astrocytes, les oligodendrocytes peuvent être réactifs à lésion des axones qu'ils myélinisent. Nous avons montré que Sema6A est fortement exprimée par les oligodendrocytes pendant la myélinisation avant de décroître chez l'adulte. Toutefois, elle est ré-exprimée suite à une démyélinisation induite par la cuprizone ou la LPC. De plus, les oligodendrocytes déficients en Sema6A ne se différentient pas correctement et la

myélinisation semble retardée chez le KO Sema6A. Nous avons utilisé des modèles de myélinisation in vitro et montré que l'ajout de protéine recombinante sema6A-Fc stimule très fortement la myélinisation. Cet effet met en jeu le récepteur plexine-A2 exprimé à la surface des axones. Ces résultats suggèrent que la Sema6A puisse intervenir dans le processus de myélinisation et être impliquées dans des maladies démyélinisantes comme la sclérose de plaques. Un brevet couvrant ces résultats et leurs applications a été déposé par l'UPMC et la société BiogenIdec. Parallèlement, nous avons mis au point une nouvelle méthode d'étude des interactions cellulaires au cours de la myélinisation et la remyélinisation. Nous avons adapté la technique génétique «Brainbow» (Développée par Jean Livet), qui est basée sur le système de recombinaison Cre/Lox, pour exprimer aléatoirement des protéines fluorescentes de différentes couleurs dans les oligodendrocytes, et obtenir ainsi un marquage multicolore de la myéline in vivo[43].

5. Imagerie 3D et son application à l'étude de l'embryologie humaine

Observer et caractériser l'organisation des structures cérébrales représente un des enjeux majeurs des Neurosciences mais les techniques classiques de microscopie ne permettent pas d'appréhender facilement la structure tridimensionnelle des connexions cérébrales. En 2014, notre équipe a mis au point une technique d'imagerie innovante permettant l'imagerie tridimensionnelle par coupes optiques d'échantillons épais, entiers (embryons de souris, cerveau postnatal) fixés et fluorescents[44]. L'idée a été de combiner trois méthodes : l'immunohistochimie in toto, la « transparisation » et l'imagerie à feuille de lumière. Les échantillons immuno-marqués entiers sont rendus transparents avec des solvants organiques, puis imagés à l'aide d'un microscope à feuille de lumière. La compilation des images obtenues permet, avec des logiciels de adaptés, la reconstruction de l'échantillon en trois dimensions. L'association de ces trois méthodes révolutionne la manière dont on peut étudier l'organisation neuro- anatomique du cerveau, mais aussi de tous les tissus[45]. Nous avons tout d'abord appliqué la méthode pour étudier l'organisation des connexions neuronales dans plusieurs lignées de souris mutantes.

Toutefois, nous avons plus récemment élargi sont champs d'application à l'embryologie humaine. En collaboration avec le Dr Paolo Giacobini (Lille) nous avons commencé à construire le premier atlas cellulaire tridimensionnel du développement embryonnaire chez l'homme (www.transparent-human-embryo.com)[46]. Ce projet s'inscrit dans une initiative internationale, le « *Human Cell Atlas* », qui ambitionne de cartographier toutes les cellules du corps humain. Je participe activement depuis maintenant une année à la mise en place de la composante développementale de cet Atlas en interaction avec l'INSERM et de nombreux laboratoires Français, Européens et Américains[47]