

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences

Ecole Doctorale Science Technologie et santé

UMR CNRS 6101

N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Isabelle COMTE

Le 4 juillet 2003

***ETUDE EXPERIMENTALE DE LA NEO-NEUROGENESE
ET DES CELLULES SOUCHES NEURALES AU SEIN DU
SYSTEME OLFACTIF AVIAIRE.***

Directeur de Thèse : Docteur Ayer-Le Lièvre Christiane.

Jury

Mme le Directeur Françoise DIETERLEN-LIÈVRE

Mme Le Directeur Christiane AYER-LE LIÈVRE

Mr Le Professeur Alain PROPPER

Mr Le Professeur Michel ROGER

Mr Le Professeur Albert FARBMAN

Mr Le Professeur Raymond JULIEN

Présidente

Directeur de Thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

A la mémoire de mon grand père et de Stéphane qui m'ont
accompagnés tout au long de cette thèse.

Remerciements

A l'occasion de cette soutenance de thèse , je tiens tout d'abord à remercier :

Madame F Dieterlen-Lièvre, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance.

Monsieur A. Propper, d'avoir aimablement accepté d'être l'un des rapporteurs de cette thèse et d'apporter ainsi sa caution scientifique de spécialiste de l'olfaction.

Monsieur M Roger, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant d'en être rapporteur et donc de m'apporter ses compétences concernant les cellules souches neurales.

Monsieur A Farbman, pour l'immense honneur qu'il m'a fait en acceptant de se déplacer depuis les Etats-Unis pour participer à ce jury. Je le prie d'accepter mes plus vifs remerciements.

Monsieur R Julien, pour m'avoir fait le grand plaisir d'accepter de juger ce travail. Qu'il sache que j'attache un grand intérêt à son jugement en tant que l'une des premières personnes m'ayant donné envie de faire de la recherche.

Madame Ayer-Le lièvre pour l'opportunité qu'elle m'a offerte en m'accueillant dans son laboratoire, ses qualités humaines. Et pour m'avoir transmis le virus de la recherche et su m'apprendre ce qu'était un véritable chercheur ce dont je lui suis très redevable.

Plusieurs personnes ont contribué au bon déroulement de ce travail, parmi elles je tiens tout particulièrement à remercier :

L'ensemble de l'équipe UMRCNRS 6101 pour leur aide, leur bonne humeur avec un clin d'œil particulier à Elodie, Zhelia, Thomas, Helan, Vincent, Lolotte et surtout à Murielle

Mes collègues de laboratoire (pour qui je l'avoue j'ai une affection particulière). Muriel qui malgré son emploi du temps plus que chargé m'a épaulé avec le sourire, Fafa qui est à la fois mon maître et un grand sage creusois et finalement Barbara pour sa patience devant ma conception un peu particulière du rangement et de l'ordre.

Cathy et Caro, pour avoir pris le temps de passer des Immunoglobulines de souris aux neurones de poulet, et avoir su écouter et comprendre avec la patience qui les caractérise, mes incertitudes.

Steph (pour ses oreilles hors du commun, son soutien sans faille et son amitié) ninie (pour sa compréhension et son écoute) christophe (pour sa patience devant mon impatience) berbert (pour sa gentillesse), fred (pour ces e-mails toujours réconfortants), Marlène (pour nos longues, très longues conversations téléphonique), Emilie (pour sa joie de vivre, nos petites discussions au coin du feu et son soutien) sans oublier Julien, Fred et Pierre (les petits nouveaux).

Mon « grand frère » qui reste indissociable de ces années de thèse, pour nos fous rires, nos coups de gueule, pour son aide qu'elle soit scientifique ou personnelle et pour son soutien sans faille durant toutes ces années. J'espère sincèrement que la fin de cette thèse sera le début d'une longue amitié. (Et pour une fois j'aimerais bien avoir raison !!!)

Mes deux petites colocataires, qui sont arrivées dans ma vie à point nommé, Emma pour ces petits plats toujours chauds et ses merveilleux gâteaux au chocolat, Fiona pour ses petits messages d'encouragements et ses nombreuses marques d'attention qui m'ont fait chaud au cœur. (Promis, j'essaierai de ne plus oublier mon cerveau au labo !!!). Merci de m'avoir attendu parfois très tard le soir et d'avoir compris mes horaires quelques peu fluctuants.

Enfin, je tiens à remercier ceux qui sans broncher pendant toute ces années m'ont écouté, m'ont soutenu, m'ont encouragé et surtout m'ont supporté: mes Parents et ma grand-Mère, qu'ils sachent par ces quelques mots que je leur en suis infiniment reconnaissante et que je leur dois tout.

Résumé en français

Cette thèse a été consacrée à l'analyse des interactions mort neuronale/néo-neurogenèse et du lignage neuronal olfactif. L'épithélium olfactif est le siège d'une neurogenèse continue par activation de cellules souches situées dans sa partie basale. Cette analyse, utilisant pour des raisons techniques le modèle aviaire, a été menée en trois temps. 1: la réponse à l'induction expérimentale d'une dégénérescence neuronale massive a été étudiée comparativement chez l'embryon et le jeune poussin, l'effet anti-apoptotique de l'IGF a ici été prouvé. 2: des marqueurs spécifiques des types cellulaires coexistant dans l'épithélium ont été identifiés et caractérisés. 3: nous avons trié par SdFFF les cellules basales horizontales confirmant leur caractère de cellules souches olfactives en étudiant leur comportement *in vitro* et *in vivo* en greffes utilisant le marquage caille/poulet. Ces résultats ont commencé à être appliqués à des cellules olfactives humaines en vue d'autogreffes thérapeutiques.

Mots clés : Epithélium olfactif, neurogenèse, mort neuronale, cellules souches, culture *in vitro*, greffes, SdFFF, marqueurs de cellules olfactives.

Abstract

In this thesis, the interactions between neuronal death and neo-neurogenesis and the neuronal olfactory lineage have been studied. In the olfactory epithelium, neurogenesis occurs throughout life depending on the activation of stem cells localized in the basal part of the epithelium. Because of technical reasons, we have chosen the avian olfactory system as experimental model to analyse these phenomena. 1:after an experimental induction of neuronal death by axotomy, neurogenesis and neuronal death have been comparatively analysed in embryos and new born chickens. 2:specific markers of the different cell types existing in the epithelium have been isolated and characterized. 3:Horizontal basal cells have been sorted by SdFFF and their behaviours have been studied *in vitro* and *in vivo* after grafts using the quail/chicken chimera model, thus confirming their stem cell characteristics. Finally, we began to apply these results to human olfactory cells in order to use them for therapeutic autografts.

Keywords : olfactory epithelium, neurogenesis, neuronal death, stem cells, grafts SdFFF, olfactory cell markers.

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	12
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	14
I-LE SYSTEME OLFACTIF PERIPHERIQUE	15
I-1 Structure de l'épithélium olfactif.....	15
I-1-1 les cellules de soutien	16
I-1-2 : Les cellules neurosensorielles	17
I-1-3 : Les cellules basales.....	20
I-2- Morphogenèse et différenciation du système olfactif périphérique....	22
I-2-1 La placode olfactive : première ébauche du système olfactif.....	22
I-2-2 : Mise en place de la cavité nasale.	25
I-2-3 : maturation de l'épithélium olfactif embryonnaire	27
II- LE SYSTÈME OLFACTIF PÉRIPHÉRIQUE : UN MODÈLE DE RÉGÉNÉRATION NEURONALE.....	32
II-1: mise en évidence du renouvellement neuronal au sein de l'épithélium olfactif.....	32
II-2 Dégénérescence neuronale au sein du système olfactif périphérique..	34
II-2-1 Apoptose et nécrose.....	34
II-2-2 Apoptose au sein de l'épithélium olfactif.....	36
II-2-3 : Les récepteurs de mort : principaux acteurs de l'initiation de l'apoptose au sein du système olfactif périphérique.	41
II-3 : Interaction mort neuronale et neurogenèse	43
II-4 : les cellules souches à la base du renouvellement neuronal.....	46
II-4-1 : les cellules souches de l'épithélium olfactif :	46
III- RÉGULATION DE LA NEUROGENÈSE AU SEIN DE L'ÉPITHÉLIUM OLFACTIF.	55

III-1 : Les neurotrophines.....	56
III-1-1 : expression des récepteurs à haute affinité au sein du système olfactif.	56
III-1-2 : Fonction des neurotrophines au sein du système olfactif :	57
III-2 : Les facteurs de croissance de la famille FGF.....	58
III-3 : les facteurs de croissance de la famille EGF :	60
III-4: La famille des IGFs (insulin like growth factors).....	62
III-5 : Les facteurs de croissance de la super famille TGF β	64
III-6 : Vue générale de l'action des facteurs de croissance sur les cellules de l'épithélium olfactif :	66
IV : CELLULES SOUCHES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL ET CELLULES SOUCHES OLFACTIVES	68
IV-1 : Les cellules souches du système nerveux central	68
IV-2 : Similarités entre les cellules souches du système olfactif et du système nerveux central.....	69
<i>BUT DU TRAVAIL</i>	<i>71</i>
<i>MATÉRIELS ET MÉTHODES</i>	<i>74</i>
I MATÉRIEL BIOLOGIQUE	75
I-1 : Modèle animaux	75
I-2 : Cellules humaines.....	75
II-1 Lésions	76
II-1-1 Axotomies.....	76
II-1-2. Application d'IGF-1	77
II-1-3 Analyses Statistiques	77
II-2 Prélèvements d'épithéliums olfactifs et cultures primaires :	77
II-2-1 : cultures primaires aviaires	77
II-2-2 cultures primaires humaines	78

II-3 : Tri cellulaire et cultures des cellules triées	79
II- 4 : Applications de facteurs de croissance <i>in vitro</i>	80
II-5 Greffes des cellules triées par FFF.	80
III TECHNIQUES HISTOLOGIQUES	82
III-1 Préparations des échantillons	82
III-2 Techniques d'Immunohistologie et Immunocytochimie	83
III-3 Techniques de détection de prolifération cellulaire (BrdU):.....	85
III-4 Techniques de détection de l'apoptose.....	86
III-4-1 : Fragmentation de L'ADN génomique <i>in vitro</i>	86
III-4-2 : TUNEL	87
IV TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRES.....	89
IV-1 : Hybridation in situ : analyse spatio-temporelle de l'expression de gènes	89
IV-1-1 Préparation, vérification et marquage des sondes	90
IV-1-2 Hybridation <i>in situ</i>	94
IV-2 : "Differential Display" ou DDRT:	96
IV-2-1 Comparaison avec les banques de données.	96
IV-2-2 Northern blot et Southern blot	96
IV-2-2-2 : Préparation de la sonde radioactive :	97
IV-2-3 : Criblage d'une banque d'ADN génomique :	102
IV-2-4 :Purification de l'ADN phagique.....	104
IV-2-5 : Etude des clones phagiques	104
IV-2-6 Amplification rapide des extrémités 3' et 5' d'ADNc.....	105
RÉSULTATS	108
I- SYNTHÈSE ARTICULÉE DES ARTICLES 1,2,3	109
II-ARTICLE 1	111

<i>Differential responses of olfactory neurons to deafferentation at embryonic and post-natal stages</i>	111
III-ARTICLE 2	113
<i>Insulin-like growth factor I induced survival of deafferented olfactory neurons in the chick</i>	113
IV-ARTICLE 3	115
<i>Cyclooxygénase 2 tissue distribution and developmental pattern of expression in the chicken</i>	115
V-SYNTÈSE ARTICULÉE DES ARTICLES 4,5,6	117
VI-ARTICLE 4	119
<i>Developmental changes of keratin expression pattern in the olfactory epithelium of chick embryo in relation with cellular differentiation and neurogenesis in vivo and in vitro</i>	119
VII-ARTICLE 5	121
<i>Purified Olfactory Horizontal Basal Cells act as Stem cells in vitro</i>	121
VI-ARTICLE 6	123
<i>Fas expression by neurosphere-forming cells from human primary olfactory cell in vitro</i>	123
IX- RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES DES DIFFÉRENTS TRAVAUX EN COURS	125
IX-1: Isolation de nouveaux marqueurs.....	125
IX-1-1 : Introduction.....	125
IX-1-2 : Démarche expérimentale :.....	126
IX-1-3 : Etude de l'expression spatio-temporelle des gènes correspondants aux fragments isolés par DDRT :	127
IX-1-4 Clonage des gènes correspondant aux fragments isolés par DDRT.....	135
IX-1-5 Discussions et perspectives	138

IX-2: Greffes des cellules souches purifiées par FFF et conditionnées <i>in vitro</i>	144
IX-2-1 : Introduction.....	144
IX-2-2 : Démarche expérimentale.....	145
IX-2-3 : Résultats préliminaires des greffes au niveau du télencéphale d'un embryon de poulet E3 de cellules souches neurales olfactives de caille triées par FFF.....	146
IX-2-4 Discussions et perspectives	149
DISCUSSION GÉNÉRALE	152
I-DÉGÉNÉRESCENCE NEURONALE	155
II- RÉGÉNÉRATION NEURONALE.....	158
II-2- Marqueurs des différents types cellulaires olfactifs.....	159
II-2-1 Marqueurs isolés par DDRT.....	159
II-2-2 - La kératine : marqueur des cellules basales horizontales et des cellules de soutien :	161
II-3 Les cellules basales horizontales : cellules souches présumées de l'épithélium olfactif aviaire.....	162
II-4 Régulation de la neurogenèse olfactive aviaire	164
II-4-1 : L'IGF-1.....	164
II-4-2 : Le NGF	165
II-4-3 : Le FGF2.....	166
III- INTERACTION MORT NEURONALE/NEUROGENÈSE	168
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	170
BIBLIOGRAPHIE	173

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le travail exposé dans cette thèse a été consacré à l'analyse des processus gouvernant les phénomènes de neurogenèse et de mort neuronale du système olfactif périphérique aviaire : il concerne plus précisément l'étude du lignage neuronal olfactif et des interactions mort neuronale/neurogenèse. Il est maintenant clairement établi que l'épithélium olfactif est le siège d'un renouvellement neuronal continu et ceci à partir d'une population de cellules souches situées dans la partie basale de l'épithélium olfactif. Cependant l'identité précise de ces cellules souches restait encore à définir. De plus, une dégénérescence massive des neurones olfactifs provoque au sein de l'épithélium une neurogenèse accrue suggérant l'existence d'interactions entre mort neuronale et neurogenèse. Cependant peu de données sont disponibles concernant ces interactions.

L'objectif de ce travail a donc été de tenter d'élucider les questions concernant:

1- les mécanismes de régulation de la neurogenèse olfactive et de ses interactions avec la mort neuronale.

2- l'identification des cellules du lignage neuronal de l'épithélium olfactif, des cellules souches aux neurones matures.

Dans un premier temps, la réponse à l'axotomie a été étudiée comparativement chez l'embryon et le poussin nouveau-né de manière à déterminer si les neurones embryonnaires présentent des caractéristiques communes avec les neurones matures

Ensuite, ayant choisi le système olfactif aviaire comme modèle d'étude pour des raisons techniques (accessibilité du nerf olfactif), nous avons dû caractériser des marqueurs permettant de différencier les divers types cellulaires qui coexistent au sein de l'épithélium olfactif. Enfin, en privilégiant l'hypothèse selon laquelle les cellules

basales horizontales seraient les cellules souches du système olfactif, nous avons trié ces cellules par la technique de SdFFF et étudié leurs comportements selon différentes conditions de cultures.

L'ensemble des résultats obtenus semble aller dans le sens des hypothèses envisagées à savoir que les cellules basales horizontales se comportent comme des cellules souches neurales et qu'il semble bien exister une interaction entre la mort et la neurogenèse au sein de l'épithélium régulée de manière complexe que ce soit au niveau moléculaire et cellulaire.

Enfin ces travaux, nous ont permis d'envisager des perspectives thérapeutiques à long terme utilisant des cellules souches olfactives pour des greffes réparatrices au niveau du système nerveux central de patient atteint de lésions ou de maladies neurodégénératives.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I-LE SYSTEME OLFACTIF PERIPHERIQUE

Le système olfactif est capable de reconnaître un grand nombre d'odeurs différentes. **L'épithélium olfactif** ou système olfactif périphérique est l'organe récepteur capable de reconnaître les différentes molécules odorantes. Le message olfactif qu'elles contiennent est alors transmis par le **nerf olfactif** jusqu'au **bulbe olfactif** (système central olfactif), où débute le traitement de l'information olfactive.

I-1 Structure de l'épithélium olfactif

L'épithélium olfactif tapisse les parois situées dans la partie profonde de la cavité nasale. Chez les vertébrés, la cavité nasale est divisée en trois compartiments : la chambre antérieure couverte d'un épithélium pseudo-stratifié squameux, la chambre moyenne tapissée d'épithélium respiratoire cilié et la chambre postérieure où est situé l'épithélium olfactif. Ce dernier recouvre les cornets les plus postérieurs et se trouve au contact d'un air chauffé et humidifié grâce aux deux chambres précédentes. De plus, chez la plupart des mammifères les nombreuses circonvolutions des cornets nasaux augmentent la surface de l'épithélium olfactif (Farbman, 1992). Chez les oiseaux, il n'existe qu'un seul cornet tapissé, par l'épithélium olfactif. Il est maintenu dans des conditions d'hydratation appropriées à son fonctionnement grâce à la présence du mucus sécrété par les glandes de Bowman qui forment une couche épaisse à sa surface externe. L'épithélium olfactif possède l'apparence d'un épithélium stratifié. La plupart des cellules le composant ayant des contacts directs avec la lame basale, on le définit plutôt comme un **épithélium de type pseudo-stratifié**.

L'épithélium olfactif est constitué de 3 types majeurs de cellules. Les cellules de soutien, les cellules neurosensorielles (ou neurones olfactifs) et les cellules basales parmi lesquelles, on peut distinguer les cellules basales globulaires et les cellules basales horizontales (Figure 1). En outre, les glandes de Bowman localisées dans la sous muqueuse sécrètent du mucus dans la cavité nasale par l'intermédiaire de canaux excréteurs traversant l'épaisseur de l'épithélium (Farbman, 1992).

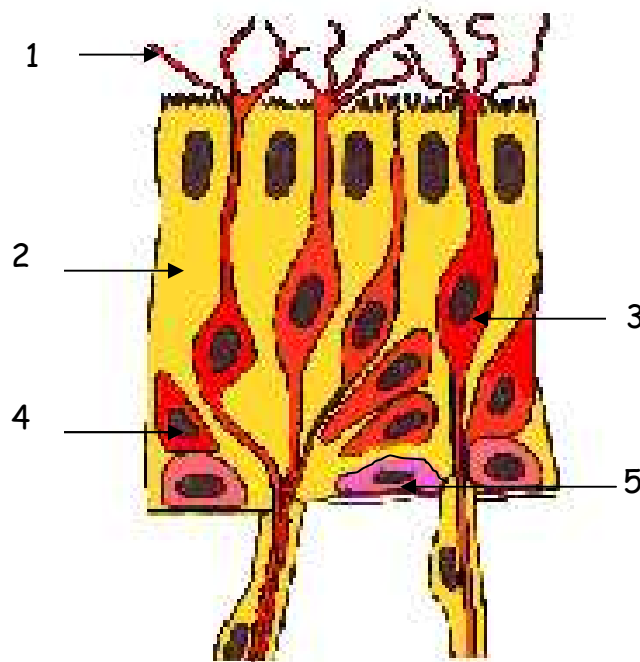


Figure 1 : structure de l'épithélium olfactif

(1) :cils dendritiques. (2) :cellules de soutien. (3) : cellules neurosensorielles. (4) :cellules basales globulaires. (5) : cellules basales horizontales.

I-1-1 les cellules de soutien

Les cellules de soutien de l'épithélium olfactif sont des cellules non-neuronales qui s'étendent de la lame basale jusqu'à la lumière de la cavité nasale. Leurs noyaux sont localisés dans le tiers apical de l'épithélium. Contrairement à l'épithélium respiratoire possédant plutôt une structure ciliée, la présence de microvillosités dans la partie apicale des cellules de soutien permet de différencier ces deux types d'épithéliums. De plus, ces cellules séparent et enveloppent partiellement les neurones olfactifs.

Elles possèdent deux fonctions principales. Tout d'abord, elles participent à la régulation de la composition ionique du mucus, modifiée lors de la stimulation olfactive. Elles interviendraient également dans des fonctions de détoxification des molécules odorantes avec intervention du cytochrome P450 (Ding et Coon, 1988; Chen et al., 1992). Enfin, chez le rat, il a été montré que les cellules de soutien expriment les kératines 8 et 18 qui sont généralement présentes au niveau des épithéliums simples notamment de l'épithélium respiratoire (Schwob et al., 1995). Ces protéines sont des constituants majeurs du cytosquelette cellulaire. Ainsi, les cellules de soutien, d'une part par leur morphologie et d'autre part par l'expression de kératines, pourraient intervenir dans la cohésion de l'épithélium. Deux autres marqueurs protéiques sont utilisés pour identifier les cellules de soutien présentes au sein de l'épithélium olfactif des vertébrés. Ces protéines non encore identifiées sont reconnues spécifiquement par les anticorps SUS-1 et SUS-4 (Hempstead et Morgan J.I., 1985). De tels marqueurs permettent ainsi de combler le manque d'identificateur des différents types cellulaires qui coexistent au sein de l'épithélium. Il est toutefois à noter que ces deux types de marqueurs n'ont actuellement pas encore été testés chez le poulet.

I-1-2 : Les cellules neurosensorielles

Les cellules réceptrices du système olfactif sont des neurones bipolaires dont le corps cellulaire est localisé dans le tiers médian de l'épithélium. Ces neurones envoient un axone non myélinisé unique qui traverse la lame criblée de l'os ethmoïde chez les mammifères. Les filets nerveux traversant la lame criblée pénètrent dans le bulbe olfactif où ils forment des jonctions synaptiques avec les neurones de second ordre (cellules mitrales et cellules à panache) au niveau des glomérules olfactifs. Chez le poulet, l'ensemble des axones des cellules neurosensorielles de l'épithélium olfactif forme un seul nerf olfactif de chaque côté, courant le long du septum en position relativement superficielle sous l'os frontal ce qui le rend facilement accessible. A l'opposé de l'axone, un dendrite se projette vers la lumière de la cavité nasale et se

termine par une protubérance portant 5 à 20 cils dendritiques. Ces cils baignent dans l'épaisse couche de mucus qui tapisse l'épithélium et sont le siège de la réception des signaux olfactifs (Farbman, 1992). La membrane de ces cils porte des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine *G* identifiés en premier chez le rat par Buck et Axel en 1991 conformément aux trois hypothèses émises selon lesquelles :

1- Les récepteurs font probablement partie de la superfamille des protéines réceptrices qui transmettent des signaux intracellulaires par couplage à des protéines *G*.

2- Il semblerait que ces récepteurs soient codés par une immense famille multigénique susceptible de présenter une grande diversité indispensable pour permettre la discrimination d'un nombre presque illimité de molécules odorantes.

3- L'expression de ces récepteurs est limitée à l'épithélium olfactif et évidemment aux neurones sensoriels. Ainsi, En partant de ces trois hypothèses et en s'appuyant sur des techniques d'amplification par PCR avec des amorces réalisées à partir des séquences des régions conservées de la partie transmembranaire des récepteurs similaires déjà connus, tels que les récepteurs β -2 adrénergiques qui répondaient le mieux aux caractéristiques définies pour d'hypothétiques récepteurs aux molécules odorantes (Lancet, 1986), Buck et Axel ont pu identifier 18 membres différents d'une nouvelle, et extrêmement grande famille multigénique codant pour des protéines à 7 domaines transmembranaire (Buck et Axel, 1991).

La fixation des molécules odorantes au récepteur provoque un changement de conformation du récepteur suivi de l'activation d'une voie de transduction qui implique soit l'AMPC et l'adénylate cyclase soit l'inositol triphosphate (ou IP_3) après activation de la phospholipase *C*. La dépolarisation membranaire, avec l'ouverture de canaux ioniques, qui s'ensuit se propage jusqu'au soma puis tout le long de l'axone vers le bulbe olfactif.

Un des marqueurs les plus utilisés pour identifier les neurones olfactifs matures des mammifères est l'olfactory marker protein (OMP) (Margolis, 1972). Cependant, cette protéine n'étant pas exprimée au sein des neurones olfactifs du poulet, la

calmoduline kinase II (CamKII) est utilisée pour l'identification des neurones olfactifs aviaires (Leibovici et al., 1996). Toutefois, ce marqueur n'est pas comme l'OMP chez les mammifères, spécifique des neurones matures, puisqu'il est également exprimé au niveau de neurones immatures.

On peut noter que les neurones olfactifs sont les seuls neurones qui établissent des contacts directs à la fois avec l'environnement extérieur et avec le système nerveux central. Ils constituent donc une porte d'entrée potentielle pour des éléments pathogènes et sont soumis à de nombreux stress qui les fragilisent. En conséquence, leur durée de vie n'est en moyenne que de quelques semaines et pour compenser la disparition régulière des cellules différenciées, les neurones olfactifs possèdent la particularité d'être renouvelés tout au long de la vie à partir de cellules souches (Graziadei, 1973). D'après certaines études, après la dernière mitose des précurseurs neuronaux, une semaine est nécessaire à la différenciation complète d'un neurone olfactif (Mirgall and Monti Graziadei, 1982. Schwob et al., 1992).

Au sein de l'épithélium olfactif mature coexistent des cellules correspondant à tous les stades de la différenciation allant des cellules souches jusqu'aux neurones matures. Les noyaux des neurones immatures sont donc situés dans différents niveaux compris entre le tiers médian et le tiers inférieur de l'épithélium (Figure1). Chez les mammifères, ces cellules expriment à un taux élevé la protéine Gap 43, et contrairement aux neurones totalement différenciés, elles n'expriment pas l'OMP et ne possèdent pas de protubérances ciliées à leur extrémité dendritique (Verhaagen et al., 1989 ; Meiri et al., 1991 ; Schwob et al., 1992). Il est également à noter que les neurones matures comme les neurones immatures expriment la protéine neuronale d'adhésion cellulaire N-CAM (Calof and Chikaraishi, 1989). Les neurones olfactifs contrairement à la plupart des neurones matures ne synthétisent pas de neurofilaments (Vollrath et al., 1985, Yamagishi et al., 1989). Toutefois, ces neurones continuent de

produire la vimentine qui est d'une manière générale exprimée de manière transitoire au cours du développement neuronal (Cochard et Paulin, 1984).

I-1-3 : Les cellules basales

Deux types de cellules localisées dans le tiers basal coexistent au sein de l'épithélium olfactif : les cellules **basales horizontales** (ou HBCs) et les cellules **basales globulaires** (ou GBCs) (Andres, 1966 ; Graziadei and Graziadei, 1979a). Ces deux types cellulaires sont le plus souvent distingués sur des critères histologiques.

❖ Les cellules basales horizontales

Les cellules basales horizontales (HBCs) sont localisées dans le compartiment le plus basal de l'épithélium olfactif et reposent sur la lame basale. Des études de microscopie électronique ont identifié ces cellules comme des cellules allongées possédant un noyau sombre (Graziadei and Graziadei, 1979a). Du fait de leur localisation, les HBCs sont au contact des neurones. Elles forment avec la lame basale un tunnel dans lequel s'engagent les axones des neurones matures. La proximité entre les neurones matures et les HBCs permet de suggérer qu'il pourrait y avoir des interactions entre ces deux types cellulaires. Ainsi des signaux pourraient passer des HBCs vers les axones des neurones olfactifs et inversement.

Les cellules basales horizontales expriment différents marqueurs permettant de les identifier tels que les **kératines 5 et 14** (Calof and Chikaraishi, 1989 ; Suzuki and Takeda, 1991 ; Holbrook et al., 1995), le récepteur à l'**EGF** (Epidermal growth factor) (Holbrook et al 1995, Rama Krishna et al., 1996) ainsi que des **résidus glycosylés reconnus par la lectine Griffonia**. Enfin, ce type cellulaire montre un taux de prolifération relativement faible (Holbrook et al., 1995).

❖ **Les cellules basales globulaires (GBCs).**

Les cellules basales globulaires (GBCs) peuvent être différenciées des cellules basales horizontales, d'une part par leur localisation et leur morphologie et d'autre part par l'expression ou non de marqueurs spécifiques. Morphologiquement, ces cellules sont plus sphériques et leur localisation au sein de l'épithélium est plus apicale que celle des HBCs (Farbman, 1992). Contrairement à ces dernières, les GBCs ne synthétisent pas de kératine. Un des marqueurs de ce type cellulaire chez les mammifères est reconnu spécifiquement par l'anticorps monoclonal **GBC-1** dirigé spécifiquement contre les cellules globulaires (Glodstein and Schwob, 1996).

Parmi l'ensemble des cellules globulaires, il est possible de distinguer différentes sous-populations par l'expression de marqueurs spécifiques. Ainsi et d'une manière générale, deux sous-populations de GBCs coexistent dans l'épithélium olfactif. Une première population considérée comme la plus immature exprime chez la souris le facteur de transcription à motif *hélice boucle hélice* **MASH-1**. Chez le poulet, les GBCs les moins différenciées expriment l'homologue de MASH-1, **CASH-1** (Cau et al., 1997 ; Gordon et al., 1995 ; Leibovici et al., 1995). La seconde population de GBCs exprime un gène de la neurogenèse activée par Mash1 chez la souris : **la neurogénine 1** (Ngn 1) (Cau et al., 1997. Calof et al., 2002). Enfin dans les conditions normales, les cellules globulaires montrent un taux de prolifération élevé (Schwartz Levey et al., 1991 ; Huard and Schwob, 1995).

Type cellulaire <i>in vivo</i>	Marqueurs moléculaires	
	rongeurs	poulet
HBCs	Kératine 5 Kératine 14	
GBCs	Mash1 Ngn1 GBC-1	Cash1 Ngn1
Cellules de soutien	Kératine 8 Kératine 18 SUS-1 SUS-4	
neurones	OMP NCAM* GAP43 Vimentine*	NCAM* CamKII*

Tableau 1 : Principaux marqueurs utilisés pour identifier les différents types cellulaires composant l'épithélium olfactif. Les marqueurs suivis de * sont des marqueurs exprimés à la fois par des neurones immatures et matures.

I-2- Morphogenèse et différenciation du système olfactif périphérique.

La morphogenèse du système olfactif peut se diviser en trois grandes étapes : la formation de la **placode olfactive**, de la **cavité nasale** et enfin la **maturation de l'épithélium olfactif embryonnaire**. Ces principales étapes sont similaires chez les mammifères et les oiseaux, cependant leur synchronisation varie d'une espèce à l'autre. (Brunjes et Frazier, 1986., Farbmann, 1992., pour revue Ayer- le Lièvre et al., 1995, 2000.)

I-2-1 La placode olfactive : première ébauche du système olfactif

La formation de la placode olfactive consiste en deux événements principaux : la détermination de la zone placodale présomptive et la neurogenèse.

Les premières études concernant les étapes précoces de la morphogénèse du système olfactif ont été réalisées chez l'embryon d'oiseau par des expériences de xénogreffes cailles/poulets (Couly et Le Douarin, 1985 ; 1987). En effet les cellules de caille possèdent une hétérochromatine étroitement associée au nucléole, contrairement aux cellules de poulet dans lesquelles l'hétérochromatine est répartie dans l'ensemble du noyau (LeDouarin, 1973). Une telle différence permet donc de suivre chez les chimères caille/poulet par coloration spécifique du noyau ou par immunohistochimie (anticorps anti-QCPN) le devenir des cellules de caille lors du développement de l'embryon de poulet hôte. Ainsi différentes régions de l'extrémité antérieure de la plaque neurale d'embryons de poulet ont été substituées par des régions similaires d'embryons de cailles (Couly et Le Douarin, 1985). Les études concernant le devenir des cellules de cailles dans de tels embryons ont permis de localiser à **l'extrémité antérieure de la plaque neurale** le territoire présomptif de la placode olfactive. Cette localisation a pu par la suite être précisée par l'excision de la partie externe de l'extrémité antérieure du bourrelet neural aboutissant à une ébauche prosencéphalique normale mais à l'absence de la placode olfactive (Ayer-Le Lièvre et al., 1995).

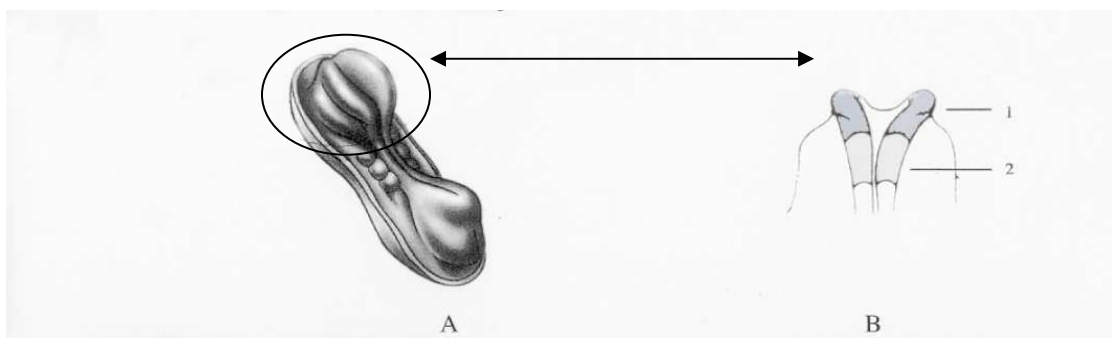


Figure 2 : Territoire des placodes olfactives d'un embryon de poulet (stade 3 somites) (A). Identification des bourrelets neuraux rostro-latéraux (1) et latéraux (2) de l'extrémité céphalique de l'embryon (B) (modifié d'après Couly et Le Douarin 1985).

Plus précisément, chez le poulet au stade E1 (de 0 à 3 somites), juste avant la fermeture du tube neural, le territoire présomptif des placodes olfactives se situe au niveau de la région antérieure du bourrelet neural (Couly et Le Douarin 1985, 1987, 1988. Ayer-Le Lièvre et al., 1995). Au stade E2 (à partir du stade 13 de Hamburger et

Hamilton), un épaissement bilatéral de la zone placodale est observé. Suite aux différents mouvements morphogénétiques de cette région, les placodes se retrouvent en position ventrale, proche de la partie antérieure du tube neural, dans la future région faciale. La placode va, au stade E3 (Stade 18-19 de H&H), s'invaginer en doigt de gants pour donner naissance par la suite aux cavités nasales.

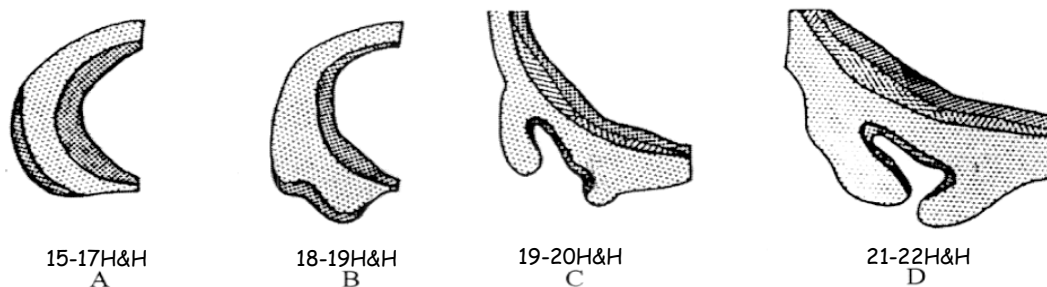


Figure 3 : épaissement (A) puis invagination progressive de la placode olfactive (B, C, D).

Au même moment, les premiers signes de la différenciation neuronale olfactive apparaissent. En effet, les premiers neurones sensoriels apparaissent dans la partie centrale de la placode olfactive et sont détectables du fait de la croissance des toutes premières fibres axonales formant le futur nerf olfactif (Van Campenhout, 1937). Le contact de ces premiers axones est nécessaire à l'induction du bulbe. Dans un même temps certains de ces neuroblastes post mitotiques quittent la placode et commencent à migrer le long du nerf olfactif en formation (Webb et Noden, 1993). Durant de nombreuses années, les auteurs pensaient que seules les cellules à LHRH (Luteinizing hormone releasing hormon) migraient de la placode vers le proencéphale mais d'autres types cellulaires ont depuis été impliqués dans de tels processus (Schwanzel-Fukuda et Pfaff, 1989, 1991., Murakami et al., 2000., Pellier et Astic, 1994a).

D'une manière générale, le long des fibres axonales et vraisemblablement impliqués dans la guidance de ces axones vers leur cible, deux types cellulaires peuvent être distingués : des cellules neuronales et des cellules non neuronales. Les cellules non neuronales se différencient soit en cellules engainantes que l'on peut définir comme un type particulier de cellules gliales du nerf olfactif (Chuah et al., 1991) soit en cellules

gliales impliquées dans le développement néo-cortical (De Carlos et al., 1995). Les cellules neuronales qui migrent de la placode olfactive sont identifiées par l'expression de marqueurs neuronaux spécifiques. Outre les cellules à LHRH, des cellules en migration exprimant l'OMP chez les mammifères (Norgren et al., 1993), la vimentine (Valverde et al., 1993), la protéine GAP43 (Pellier et al., 1994c) et les récepteurs aux odorants (OR) (Leibovici et al., 1996) ont pu être identifiées.

I-2-2 : Mise en place de la cavité nasale.

La formation de la cavité nasale chez les oiseaux débute à E2/2,5. A ce stade, les placodes olfactives apparaissent sous la forme de deux dépressions ovales qui se creusent sous la poussée du méséctoderme facial qui forme les bourgeons nasaux (Croucher et Tickle 1989). L'extrémité de ces bourgeons s'étire et une vague apoptotique permet la formation du palais primaire. Les bourgeons ne fusionnant pas complètement, les cavités nasales et buccales restent en contact même chez l'oiseau adulte. Cette fusion incomplète des processus palatins est la seule différence existant entre les mammifères et les oiseaux lors de la formation de la cavité nasale.

En effet, tout comme chez les oiseaux, la placode olfactive des mammifères s'invagine en gouttière du fait du soulèvement des bords latéraux soumis à la poussée du méséctoderme. Cette gouttière est délimitée latéralement par les bourgeons nasaux internes et externes. Ces bourgeons se rapprochent par la suite et fusionnent pour former les cavités nasales primitives. Cette fusion entraîne la formation d'un mur épithélial qui sera par la suite éliminé par une vague apoptotique de type morphogénétique survenant à E12 chez la souris et E14 chez le rat (Pellier et Astic, 1994c). Ce processus aboutit à l'isolement définitif des cavités nasales primitives de la cavité buccale.

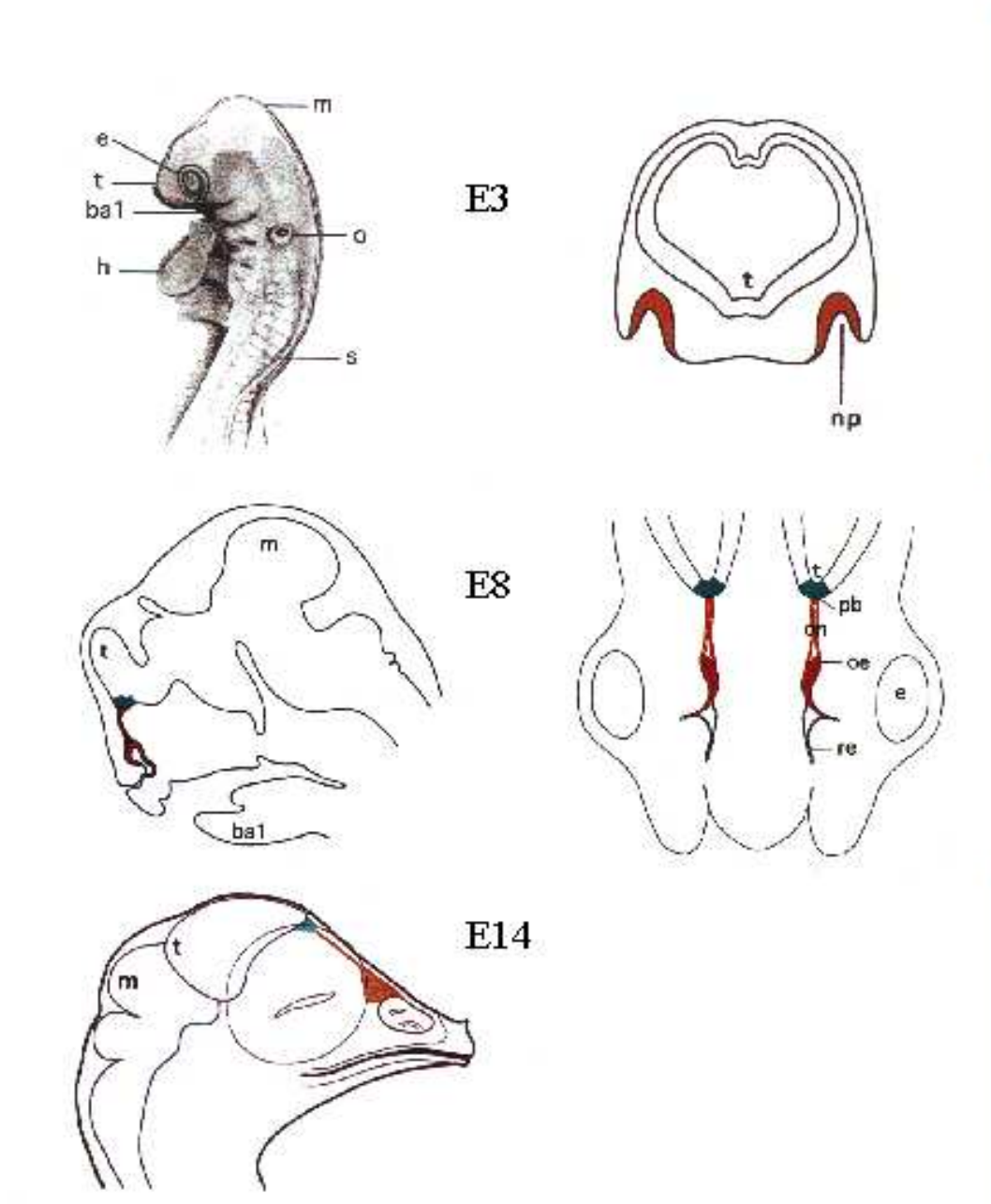


Figure 4: Morphogenèse du système olfactif chez l'embryon de poulet. En rouge apparaît la placode olfactive, en bleu le bulbe. A E3, la placode forme une invagination qui constituera plus tard la fosse nasale et les cavités nasales. A E8, le nerf olfactif est représenté en rouge, les premiers axones contactent la région du télencéphale antérieur en bleu.(Ayer-Le Lièvre et al., 1995).

I-2-3 : maturation de l'épithélium olfactif embryonnaire

❖ Chez les vertébrés

Les observations portant sur la maturation de l'épithélium olfactif ont été faites au départ essentiellement chez les mammifères et principalement le rat et la souris. La différenciation de l'épithélium peut être divisée en 5 étapes (Brunjes et Frazier, 1986).

- **Le stade placodal.**

Ce stade, à 9-10 jours de la vie embryonnaire de la souris, est marqué par la prolifération des cellules souches sensorielles situées dans la partie la plus basale de la placode. En effet, durant ce stade, la placode est composée majoritairement de deux couches de cellules. La différenciation des cellules composant la placode est caractérisée par le mélange des cellules composant ces deux couches cellulaires (Brunjes et Frazier, 1986). Une couche basale au niveau de laquelle se trouvent les cellules qui vont donner naissance aux cellules neurosensorielles et une couche plus médiane, correspondant à la localisation des cellules dont vont dériver les cellules de soutien et le canal des glandes de Bowman. Mais durant ce stade placodal, une stratification du futur épithélium olfactif est déjà observable. En effet, les noyaux des futures cellules de soutien se situent plutôt dans la partie apicale de la placode et sont minoritaires alors que les noyaux des cellules neurosensorielles sont localisés dans la partie basale proche de la membrane basale et sont plutôt majoritaires (Brunjes et Frazier, 1986). Durant cette phase de prolifération, lorsque la placode s'invagine, les cellules neurosensorielles commencent à se différencier de manière asynchrone. Ainsi à un moment donné, tous les stades de différenciation neuronale coexistent au sein de la placode (Farbman, 1992). Cependant et contrairement à ce qui est observé au sein d'un épithélium mature, la plupart des divisions cellulaires à ces stades précoces ont lieu près de la lumière de la cavité nasale. Le motif de migration des corps cellulaires, ressemble alors à celui observé au niveau du tube neural à savoir qu'après s'être divisées près de la

surface de l'épithélium, les cellules formées s'allongent et deviennent relativement fines, alors que le noyau migre plus en profondeur.

- **Stade de genèse axonale.**

Ce stade qui débute au onzième jour de la vie embryonnaire chez la souris correspond à l'apparition des premiers axones des neurones olfactifs. En effet, les axones en formation se rassemblent en petits faisceaux qui traversent la membrane basale par des brèches. Ces brèches sont formées par les prolongements cytoplasmiques de cellules endothéliales constituant les capillaires collés à la membrane basale. Les axones, au cours de leur croissance, vont être associés à deux types majeurs de cellules : les précurseurs des cellules engainantes qui vont entourer les amas axonaux et les cellules neuronales issues des régions latérales et moyennes de la gouttière olfactive (Bunjers et Frazier, 1986 ; Pellier et Astic, 1994a).

- **Stade de genèse dendritique.**

Il débute au douzième jour de la vie embryonnaire chez la souris et au quatorzième chez le rat. Ce stade correspond à l'apparition d'un bouton dendritique mature. Durant ce stade, le nombre de cellules proliférantes diminue dans la région apicale alors qu'il augmente dans la partie médiane et basale du futur épithélium olfactif (Farbman, 1992). De plus, l'organisation de ce tissu correspond déjà à celle d'un épithélium adulte (Farbman, 1992). A E13 chez la souris et E15-16 chez le rat , les premiers cils des dendrites apparaissent. Il s'agit de un à deux cils primaires qui vont être par la suite remplacés par des cils matures. Ces cils primaires sont des expansions courtes (1 à 2 μm de long) (Menco et al., 1985).

- **Stade de différenciation des neurones et de maturation des cils.**

A ce stade, les cils primaires, précédemment décrits, sont remplacés par de multiples cils, dits secondaires, aux extrémités dendritiques des neuro-récepteurs. Durant cette période (E13-14 chez la souris et E16 chez le rat), les premiers axones contactent le bulbe olfactif. Ces deux évènements semblent liés. En effet, il semblerait que l'apport de facteurs bulbaires transportés de manière rétrograde le long des axones favoriserait l'apparition de nouveaux cils.

A partir de ce stade embryonnaire, tous les stades de différenciation neuronale coexistent au sein d'un même épithélium. Cependant, si au niveau d'un épithélium adulte, les précurseurs neuronaux sont situés dans la partie basale, dans un épithélium embryonnaire, ils sont plutôt localisés près de la bordure apicale.

Le stade de maturation finale de l'épithélium olfactif correspond à la différenciation des cellules de soutien et à la formation des glandes de Bowman. Les microvillosités des cellules de soutien s'allongent à E14 chez la souris et à E18 chez le rat. On peut alors facilement identifier ces cellules à partir de E14 chez la souris par l'expression de kératine (Suzuki et Takeda, 1991).

Enfin, il est important de noter que la maturation du système olfactif se poursuit chez les vertébrés après la naissance, sans doute du fait de l'exposition de l'épithélium aux molécules odorantes. En effet, on constate que dans les 25 premiers jours de la vie, la surface de l'épithélium est multipliée par 8 et le nombre de cellules sensorielles par 12. (Farbman, 1992).

❖ **Chez les oiseaux**

La différenciation neuronale chez les oiseaux est beaucoup moins documentée. Elle débute au troisième jour de la vie embryonnaire au moment où la placode s'invagine. A ce stade, les cellules sensorielles s'allongent et les premiers axones apparaissent au niveau de cellules localisées dans le centre de la placode. Ce début de différenciation serait le résultat d'une interaction entre les cellules composant la placode et le télencéphale (Webb et Noden, 1993). Des cellules quittent la placode olfactive et migrent dans la zone riche en PSA-NCam où vont croître les axones. Trois types de cellules migrantes peuvent être distingués : les précurseurs des cellules engainantes, les neurones à LHRH qui vont rejoindre le télencéphale antérieur puis l'hypothalamus (Murakami et al., 2000) et enfin des neuroblastes dont certains exprimant des récepteurs aux odorants pourraient intervenir dans la guidage axonale (Leibovici et al., 1996, Lalloué et al., communication personnelle). Ce type d'observation permet de mieux comprendre les différentes interactions pouvant exister entre le système olfactif périphérique et le système olfactif central, interactions qui débutent lors de la vie embryonnaire mais se poursuivent tout au long de la vie.

La maturation de l'épithélium olfactif est pratiquement terminée chez les oiseaux au 16^{ème} jour de la vie embryonnaire. Sa structure est alors pseudo-stratifiée et identique à celle observée chez l'adulte. Toutefois, ce n'est que 24 à 48 heures avant l'éclosion, c'est-à-dire lorsque l'embryon casse sa coquille et respire l'air ambiant, que s'achève la maturation du système olfactif. Cependant dès le stade E13, des olfactogrammes ont pu être enregistrés en réponse à l'application de molécules odorantes. L'intensité de la réponse augmente jusqu'à la fin de l'incubation. La maturation fonctionnelle olfactive a donc lieu avant la naissance et l'embryon est capable de percevoir des odeurs au cours de la deuxième moitié de l'incubation (Lalloué et al., communication personnelle)

	Souris	Rat	Poulet
Neurulation	E8	E9	E1
Gouttière olfactive	E10	E12	E2,5
Neurogenèse axonale et migration cellulaire	E11	E13	E3
Premières cellules mitrales post-mitotiques	E11	E13	E3
Morphogenèse et formation du bulbe olfactif	E13	E14	E7
Premières synapses axo dendritiques olfacto-bulbaires	E14	E18	E8-10

Tableau 2 : Embryogénèse comparée de la souris, du rat et du poulet (modifié d'après Ayer-Le Lièvre et al., 1995)

II- LE SYSTÈME OLFACTIF PÉRIPHÉRIQUE : UN MODÈLE DE RÉGÉNÉRATION NEURONALE.

Les neurones qui constituent l'épithélium olfactif ont un contact direct avec l'environnement. Ils peuvent ainsi capter les molécules odorantes présentes dans l'air ambiant. Les neurones olfactifs du fait de cette localisation particulière sont donc soumis à de nombreux stress (expositions à des agents infectieux, des toxines etc...) et ont une durée de vie relativement brève, de l'ordre de quelques semaines. Par conséquent, le maintien d'une olfaction fonctionnelle implique un renouvellement constant des neurones olfactifs. Il existe donc, au sein de l'épithélium olfactif embryonnaire et adulte, une néo-neurogenèse continue. Cette caractéristique ainsi que sa facilité d'accès font donc de **l'épithélium olfactif un modèle d'étude privilégié de la neurogenèse**, qu'elle soit embryonnaire ou adulte.

II-1: mise en évidence du renouvellement neuronal au sein de l'épithélium olfactif.

Les premières études portant sur la neurogenèse post-natale ont débuté dans les années 1940. En effet, Nagahara a montré en 1940 que la lésion du nerf olfactif était suivie d'une régénération neuronale. De plus, une reconstitution de l'épithélium après sa destruction par du sulfate de Zinc a été observée (Smith, 1951 ; Harding et al., 1978). Ainsi, de nouveaux neurones peuvent être produits que ce soit après lésion directe de l'épithélium ou lorsque les neurones matures sont déconnectés de leur cible centrale, le

bulbe olfactif, et donc privés de leur principale source trophique. De telles expérimentations ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle au sein même de l'épithélium olfactif devaient se trouver des cellules capables de générer de nouveaux neurones. Il a donc été suggéré que la présence de cellules souches olfactives était indispensable à ce renouvellement neuronal.

Cette hypothèse a été vérifiée par quantification de la prolifération cellulaire suite à l'incorporation de thymidine tritiée. Un jour après injection, des cellules marquées sont observées dans la partie basale de l'épithélium. Environ 9 jours plus tard, de telles cellules sont retrouvées dans la partie médiane et après 20 jours dans la partie apicale de l'épithélium (Moulton et Fink, 1972 ; Graziadei et Monti-Graziadei, 1979b). Ces études ont donc permis de comprendre, d'une part que des cellules capables de renouvellement étaient présentes dans la partie basale de l'épithélium olfactif et d'autre part que ces cellules étaient capables de donner des neurones immatures (localisés dans la partie médiane) qui se différenciaient en neurones matures (dont le corps cellulaire est localisé dans la partie plus apicale de l'épithélium) (Figure 5).

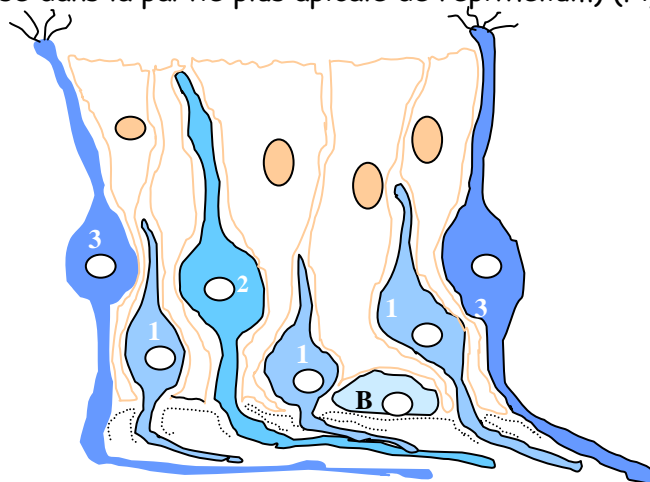


Figure 5 : Schéma des différents stades de différenciation des neurones olfactifs des cellules basales (B) aux neurones matures (3). Le corps cellulaire des neurones post-mitotiques les plus immatures (1) sont localisés plus basalement que le corps cellulaire des neurones plus différenciés (2) et matures (3). Modifié d'après Farbman 1992

Cependant les questions suivantes restaient irrésolues : quelle est la véritable identité de ces cellules souches et par quel(s) phénomène(s) la division de ces cellules est-elle activée ?

II-2 Dégénérescence neuronale au sein du système olfactif périphérique

Les neurones olfactifs ont pour particularité unique d'être à la fois en contact direct avec l'environnement et avec des neurones du système nerveux central. Cette situation particulière explique le renouvellement continu des cellules neurosensorielles olfactives durant la vie embryonnaire mais également durant la vie adulte. En effet, outre leur forte exposition à des agents toxiques, ils pourraient être également des vecteurs pour certains agents pathogènes.

II-2-1 Apoptose et nécrose

Il existe physiologiquement deux types de mort cellulaire chez les vertébrés et autres métazoaires. On peut distinguer l'apoptose, considérée comme un suicide cellulaire, de la nécrose.

❖ La nécrose

La nécrose peut être décrite comme la mort d'une cellule en réponse à un stress massif. Elle aboutit à une destruction rapide de la cellule. Ce phénomène génère une forte réaction inflammatoire, un gonflement et une lyse cellulaire.

❖ **L'apoptose**

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus physiologique se produisant durant le développement et dans différents tissus de l'organisme adulte. On considère qu'environ 50% des neurones meurent par apoptose au cours du développement (Clarke et al., 1990 ; Oppenheim et al., 1995). Cette forte apoptose, observée au niveau du système nerveux des vertébrés est la conséquence d'une production excessive de neurones. Les neurones surnuméraires meurent car ils présentent des défauts de connexions ou manquent de facteurs de croissance tels que les neurotrophines nécessaires à leur survie (Burek and Oppenheim, 1998). C'est ainsi que le NGF (premier facteur neurotrophique) a été découvert par Levi-Montalcini en 1954 (Cohen et al., 1954).

Morphologiquement, le processus d'apoptose se caractérise par une condensation du noyau, une fragmentation de l'ADN, et la formation de corps apoptotiques rapidement éliminés par les cellules voisines. La membrane cellulaire, dans ce cas là, ne se rompt pas, évitant la libération des constituants intracellulaires. De plus, les cellules en apoptose participent activement à leur propre auto-destruction via l'expression de gènes spécifiques ou l'activation d'un processus latent.

Il est à noter que ces deux types de mort cellulaire peuvent toutefois se produire simultanément dans des tissus ou des cultures de cellules exposés à un même stimulus. De ce fait, tandis que des événements précoces peuvent être communs aux deux types de mort cellulaire, un système de régulation génétique est nécessaire pour engager la cellule dans la voie apoptotique contrairement à la nécrose qui ne nécessite aucun contrôle.

II-2-2 Apoptose au sein de l'épithélium olfactif

Il a été montré que dans le cas d'une dégénérescence physiologique, les neurones olfactifs présentaient, au sein de l'épithélium, les caractéristiques de cellules apoptotiques.

II-2-2-1 : Apoptose dans les conditions physiologiques

❖ Au cours du développement

L'apoptose est, comme dans le reste du système nerveux, un processus très répandu lors de la formation de l'épithélium olfactif. Chez la souris, un petit nombre de cellules apoptotiques est observé au niveau de la placode et du mésenchyme adjacent, aux stades E11 et E12. La détection de ce faible nombre de cellules en dégénérescence est suivi par une vague apoptotique entre les stades embryonnaires E14 et E18 (Voyron et al., 1999). Ces résultats en accord avec ceux observés chez le rat (Pellier et Astic, 1994b) seraient la conséquence des premiers contacts qui s'établissent durant cette période entre les axones des neurones olfactifs et leur cible trophique c'est-à-dire le bulbe. L'apoptose décelée au niveau des neurones olfactifs durant ces stades serait donc due à un défaut de connexions de ces neurones avec les glomérules bulbaires. D'autre part durant cette vague apoptotique, des espaces extracellulaires sont créés ce qui facilite le passage des axones neuronaux en croissance et des cellules migrantes qui les accompagnent.

L'apoptose décelée au niveau de l'épithélium olfactif diminue à partir du stade E18 et E19 (c'est à dire 1 ou 2 jours avant la naissance) chez la souris pour atteindre un niveau constant qui va être maintenu chez l'adulte.

Chez les oiseaux et notamment chez le poulet, aucune donnée n'existait, avant notre étude, concernant l'apoptose au cours de la formation de l'épithélium olfactif (Mathonnet et al., 2002).

❖ **Durant la vie adulte.**

Le nombre de neurones olfactifs est étroitement contrôlé par des signaux locaux. Ainsi les neurones matures vont soit stimuler soit inhiber leur remplacement par interaction avec des cellules souches situées dans la partie basale de l'épithélium. Ainsi, du fait de ce contrôle relativement étroit, des neurones en apoptose sont observés au sein de l'épithélium (Graziadei et al., 1978). L'épaisseur de l'épithélium ne variant pratiquement pas tout au long de la vie, un contrôle relativement précis de l'équilibre vie/mort doit donc intervenir de manière à maintenir constant le nombre de neurones olfactifs présents dans l'épithélium.

D'une manière générale, les neurones olfactifs ont une durée de vie limitée qui est de l'ordre d'un mois après la différenciation pour un épithélium adulte. Cependant, cette durée de vie peut varier selon l'âge de l'animal et l'environnement dans lequel baigne l'épithélium. On observe, le plus souvent, que dans des conditions normales, l'apoptose est un phénomène limité aux cellules neuronales matures ou immatures à l'exclusion des cellules basales horizontales et des cellules de soutien (Holcomb et al., 1995).

II-2-2-2 : Apoptose dans les conditions expérimentales.

Sachant qu'il existe au sein du système olfactif un renouvellement continu et une apoptose des neurones, de nombreuses études ont été réalisées de manière à mieux comprendre ces phénomènes. Ainsi, différentes techniques visant à provoquer une dégénérescence neuronale au sein de l'épithélium, ont été mises au point. Les trois principales techniques utilisées sont la bulbectomie, l'axotomie, et l'utilisation de produits chimiques appliqués par pulvérisation dans la cavité nasale ou par injection. Ces

différentes approches n'aboutissent pas toutes systématiquement à l'apoptose des neurones.

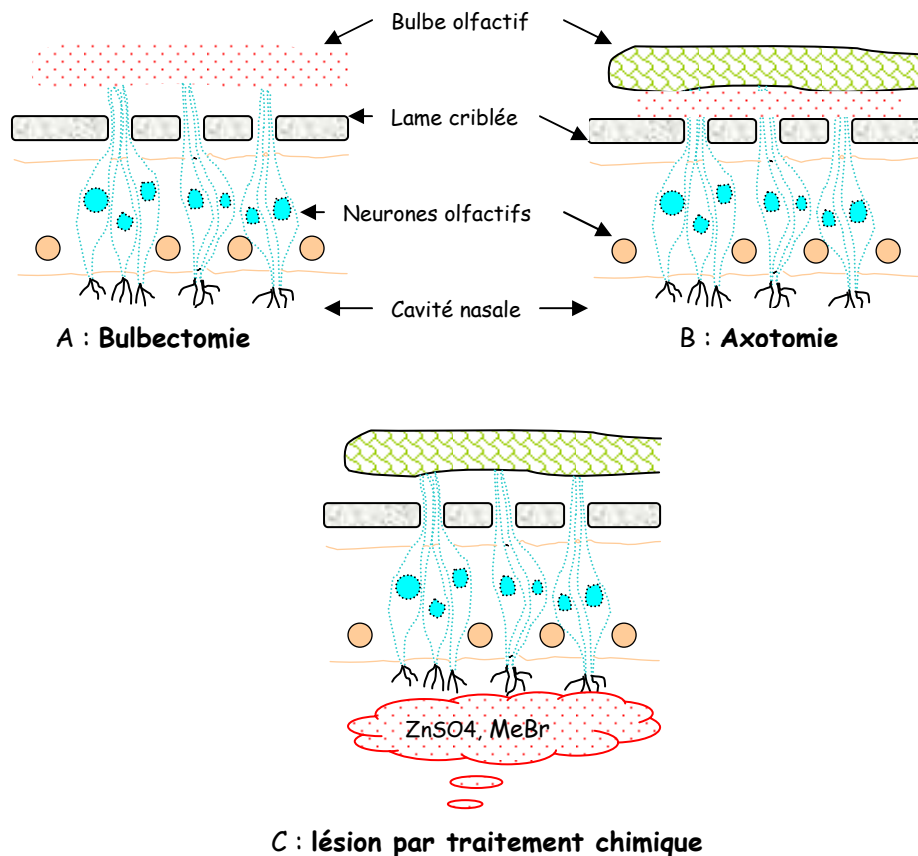


Figure 6 : Principales techniques visant à provoquer une dégénérescence neuronale au sein de l'épithélium olfactif.

❖ Bulbectomie

L'ablation du bulbe olfactif ou bulbectomie prive brutalement les cellules neuro-sensorielles olfactives des facteurs trophiques bulbaires mais également provoque une dégénérescence rétrograde et synchrone des neurones matures (Costanzo and Graziadei, 1983 ; Graziadei et al., 1979c ; Le Gros Clarke, 1951). Après bulbectomie

les neurones en dégénérescence possèdent les caractéristiques de cellules apoptotiques (Cowan et al., 2001 ; Holcomb et al., 1995 ; Morrison and Costanzo, 1989).

Chez la souris, 24 heures après bulbectomie, les premiers signes de dégénérescence apparaissent au sein de l'épithélium. Deux jours après l'ablation du bulbe, un pic d'apoptose est observé et suivi, 5 jours après, d'une disparition massive des cellules olfactives. Chez la souris, cette perte est mesurée par une diminution de l'épaisseur de l'épithélium 5 jours après la bulbectomie (Calof et al., 1996). Récemment, une relation a été établie entre la distance du corps cellulaire des neurones au site de la lésion et le délai de survenue de l'apoptose (Cowan et al., 2001).

De telles études ont montré le rôle prépondérant qu'occupe le bulbe olfactif et plus particulièrement les facteurs trophiques qu'il synthétise dans la survie des neurones olfactifs. Il y a donc une relation étroite entre le bulbe olfactif et les événements contrôlant la mort neuronale et la neurogenèse au sein de l'épithélium olfactif. Ainsi après bulbectomie, il n'y a pas de maturation complète des neurones nouvellement produits du fait de l'absence de cible centrale et de l'impossibilité de synaptogenèse périphéro-centrale pour ces neurones. Ainsi, il semblerait que la survie des neurones olfactifs dépende des facteurs bulbaires plus que des facteurs environnementaux, bien qu'une interaction entre ces deux types de facteurs soit nécessaire pour une survie neuronale optimum.

❖ **Axotomie.**

Chez la souris, l'axotomie, c'est à dire la section des filets nerveux, entraîne comme dans le cas de la bulbectomie une rapide dégénérescence rétrograde des neurones olfactifs matures. En principe, ce phénomène est observé 6 à 8 jours après l'axotomie. Mais après 10 jours, on peut observer une disparition totale des neurones marqués par l'OMP (Graziadei and Monti-Graziadei, 1978, 1980).

Il est important de noter que contrairement à la bulbectomie, il est possible d'observer après axotomie une régénération des fibres nerveuses constituant l'épithélium olfactif. Ainsi, de nouveaux neurones peuvent être formés. Et le nerf nouvellement formé est capable de reconnecter le bulbe (source trophique). Ainsi, chez le pigeon, 3 à 8 jours après la section du nerf olfactif, une dégénérescence rétrograde et irréversible des neurones peut être observée. Elle est suivie d'une neurogenèse accrue aboutissant, après 30- 50 jours, à la reconstitution complète du tissu où les neurones nouvellement formés sont tout à fait fonctionnels (Graziadei et al., 1979b). Cette technique est donc la plus appropriée pour étudier les interactions possibles entre les phénomènes de mort neuronale et de néo-neurogenèse.

Toutefois, le nerf olfactif des mammifères est difficile d'accès du fait notamment de la présence de la lame criblée de l'os ethmoïde, le plus souvent la lésion des filets nerveux implique également la lésion du bulbe olfactif. **C'est la raison pour laquelle dans ce cas, le poulet apparaît comme un modèle privilégié.** En effet, l'absence de lame criblée, la longueur du nerf, unique de chaque côté du septum et sa localisation relativement superficielle chez les oiseaux, rendent le nerf olfactif plus facilement accessible.

❖ **Lésions par traitement chimique**

Cette autre méthode visant à provoquer une dégénérescence massive des neurones olfactifs est couramment utilisée. Il s'agit d'introduire au niveau de la cavité nasale différents produits chimiques toxiques, par pulvérisation ou par injection nasale. Les produits les plus souvent utilisés sont le sulfate de zinc, le triton X-100 et le bromure de méthyle. La plupart de ces produits provoquent une nécrose des neurones et non une apoptose contrairement à ce qui est observé après bulbectomie ou axotomie. Il a notamment été montré qu'après lésion de l'épithélium olfactif de souris adultes (6

mois) et jeunes (1 mois) par injection nasale de sulfate de zinc, la destruction totale des cellules neurosensorielles était suivie par une régénération tissulaire et fonctionnelle dans les semaines qui suivent (Ducray et al., 2002). Ce type de techniques reste toutefois souvent utilisées car il semble proche des processus physiologiques observés dans l'environnement, et notamment lorsque l'épithélium est soumis à des stress toxiques. Ces lésions chimiques permettent également de manière aisée et efficace de ne léser que les cellules de l'épithélium chez les mammifères contrairement à la bulbectomie considérée comme une technique relativement invasive. Il est également à noter que ce type de traitement ne peut être utilisé chez les oiseaux ; la cavité nasale n'étant pas isolée de la cavité buccale.

II-2-3 : Les récepteurs de mort : principaux acteurs de l'initiation de l'apoptose au sein du système olfactif périphérique.

D'un point de vue moléculaire, l'apoptose peut généralement être divisée en trois événements majeurs : l'initiation, la propagation et enfin la terminaison du signal apoptotique.

Le signal déclenchant l'apoptose peut être extracellulaire et est reçu par les récepteurs de mort. Une fois la transduction enclenchée, elle va entraîner une cascade intra-cellulaire d'événements moléculaires aboutissant finalement à la mort neuronale par apoptose.

Au sein du système olfactif, trois récepteurs de mort sont présents majoritairement: **TNFR** (tumor necrosis factor receptor), le récepteur **Fas** et le récepteur **P75**. La liste faite ici n'est pas exhaustive mais correspond aux molécules le plus souvent retrouvées.

Les ARNs messagers correspondant au récepteur Fas et à son ligand ainsi que ceux correspondant au TNFR et à son ligand TNF α sont tous détectés au sein des

neurones olfactifs du rat adulte (Farbman et al., 1999). Plus précisément, Fas-ligand est localisé au niveau de la protubérance dendritique et au niveau axonal. Le fait qu'un même neurone produise à la fois le récepteur et le ligand de Fas, laisse envisager différentes hypothèses. D'une part, il pourrait y avoir au sein d'un neurone des événements intrinsèques permettant l'interaction du ligand et de son récepteur. En effet, Fas-ligand peut exister à la fois sous une forme soluble et sous une forme ancrée dans la membrane. Dans le cas, d'une sécrétion de Fas-ligand, il peut être envisagé que cette molécule agisse de manière autocrine. D'autre part, l'activation d'un récepteur situé à la surface d'un neurone pourrait être provoquée par le ligand produit par une autre cellule. Cette dernière hypothèse impliquerait une forte interaction entre les neurones qui coexistent au sein d'un même épithélium.

Il a été également montré que, dans une organo-culture d'épithélium olfactif d'un fœtus de rat (E19), l'addition de Fas-ligand ou de TNF α provoque après 4 à 6 heures une augmentation du nombre de cellules apoptotiques (Farbman et al., 1999).

Le récepteur à faible affinité au NGF, p75, peut avoir selon l'environnement cellulaire et selon la présence ou non de neurotrophines un rôle pro ou anti-apoptotique (Kaplan et Miller, 2000). Au sein du système nerveux central p75 aurait le plus souvent un rôle pro-apoptotique (Armstrong et al., 1991 ; Barrett et Bartlett, 1994 ; Roux et al., 1999). Dans le système olfactif, p75 est exprimé au niveau des cellules engainantes avec un maximum d'expression durant le développement et après lésion du nerf olfactif (Gong et al., 1994 ; Turner et Perez-Polo, 1993). Chez les rats nouveaux nés et adultes, p75 est exprimé par les neurones au niveau des terminaisons synaptiques (Roskams et al., 1996 ; Turner et Perez-Polo, 1992). Enfin, l'application d'une toxine spécifique des neurones exprimant p75 entraîne une forte diminution du nombre de synapses qui s'établissent entre les neurones olfactifs et les cellules mitrales du bulbe (Pallera et al., 1994). Cette observation fait de p75 un excellent candidat comme intervenant dans la

transmission des signaux de mort et de survie entre les neurones olfactifs et les cellules bulbaires.

II-3 : Interaction mort neuronale et neurogenèse

L'épithélium olfactif est un bon modèle pour étudier les interactions entre neurogenèse et mort neuronale. L'équilibre entre mort neuronale d'une part et neurogenèse d'autre part permet de réguler le nombre de neurones au cours du développement et de la régénération en réponse à une lésion.

La perte neuronale, mesurée par l'épaisseur de l'épithélium montre un maximum 5 jours après ablation du bulbe olfactif chez la souris. Elle est suivie par la prolifération des précurseurs neuronaux qui est à son maximum 5 à 6 jours après l'opération puis l'épithélium s'épaissit jusqu'à 70% de sa hauteur originale (Calof et al., 1996). De plus une dégénérescence massive des neurones olfactifs est observée 3 jours après section du nerf et est corrélée à la prolifération accrue des cellules basales, mise en évidence par l'incorporation de thymidine tritiée (Farbmann, 1992). Enfin, l'analyse moléculaire de l'épithélium olfactif d'un embryon de poulet ayant subi une axotomie révèle des modifications relativement précoces. Outre la dégénérescence précoce caractérisée par la perte de marqueurs de différenciation, l'expression de *Cash 1* est stimulée au niveau de l'épithélium 40 heures après la section du nerf. Ceci pourrait indiquer une stimulation de la neurogenèse (Leibovici et al., 1996). L'activation de *Cash 1* pourrait entraîner une différenciation neuronale rapide.

Ces différentes études suggèrent donc l'existence d'une relation entre la neurogenèse et la mort des cellules neurosensorielles de l'épithélium olfactif. Des interactions cellulaires et moléculaires pourraient être impliquées dans de tels processus. De plus, par analogie avec le développement embryonnaire, les gènes

proneuronaux (comme *Cash1*) et les gènes de la neurogenèse pourraient intervenir dans des étapes précoces de régénération de l'épithélium. La relation temporelle entre la mort des neurones matures, la dégénérescence cellulaire, la prolifération des précurseurs et la formation de nouveaux neurones suggère deux modèles d'interactions cellulaires.

❖ Premier modèle ou modèle de stimulation directe :

Dans cette hypothèse, les neurones matures émettent un signal activant directement la prolifération des précurseurs neuronaux et ainsi la neurogenèse. On peut donc supposer que les neurones en dégénérescence modifieraient leurs interactions qu'elles soient cellulaires ou moléculaires avec les cellules souches voisines, entraînant une activation ou une levée d'inhibition de leur prolifération.

❖ Second modèle ou modèle d'inhibition par rétrocontrôle.

Dans ce cas, la prolifération des précurseurs, en réponse à la disparition des neurones matures, serait le résultat d'une interruption, d'un signal inhibiteur, de la prolifération des précurseurs ou des cellules souches, provenant des neurones. Cette dernière hypothèse semble vérifiée par des études concernant le rôle d'un facteur de croissance particulier au sein du système olfactif : le BMP4 (Bone Morphogenic Protein 4). Cette protéine pourrait jouer un rôle dans le modèle d'inhibition par rétrocontrôle. A l'opposé de l'inhibition de la prolifération des cellules olfactives *in vitro* pour de fortes concentrations (10-20ng/ml), de faibles concentrations (0,1-0,2ng/ml) de BMP4 favorisent cette prolifération ainsi que la survie des cellules neuronales de l'épithélium olfactif. Il est également à noter que chez le rat adulte, l'ARN m correspondant au BMP4 est détecté au niveau des neurones olfactifs (Shou et al 1999). Un des scénarios

possibles serait que lorsque les neurones matures meurent, le taux de BMP4 diminue au sein de l'épithélium. Cette forte diminution pourrait être perçue comme un signal d'activation pour les cellules souches permettant ainsi la formation de nouveaux neurones. Lorsque la population totale de neurones est restaurée, la concentration de BMP4 (produite par les neurones) serait alors suffisamment élevée pour inhiber la prolifération des précurseurs (Calof et al., 2002)

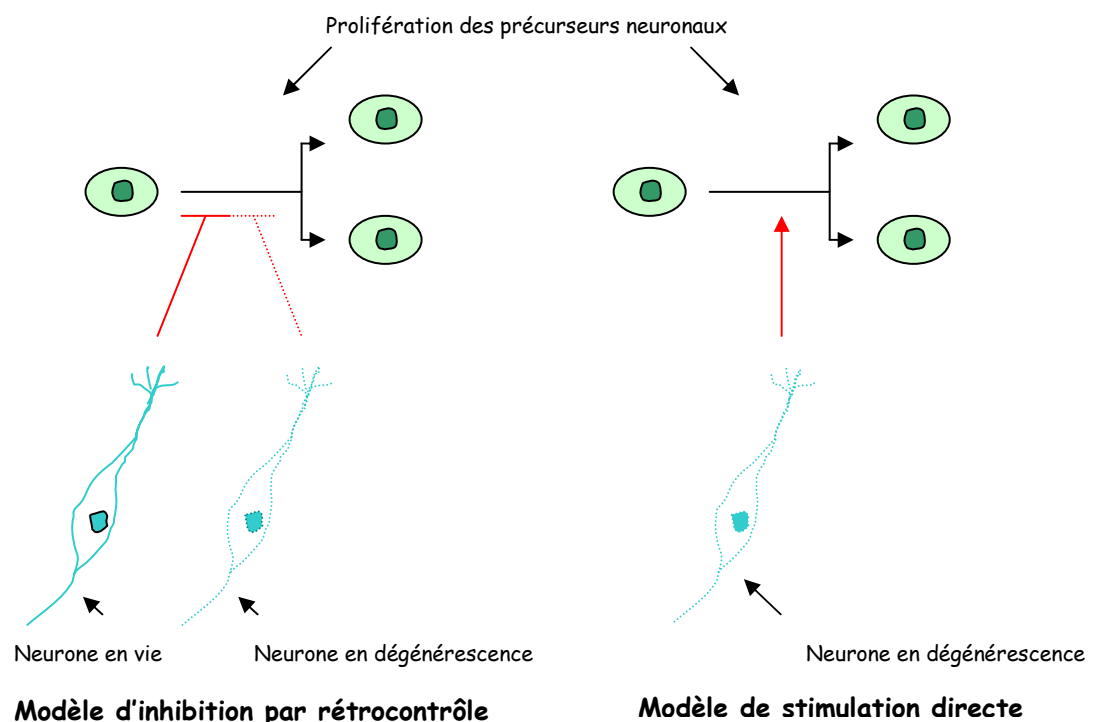


Figure7 : Mécanisme d'activation hypothétique des précurseurs neuronaux par les neurones matures

Modèle d'inhibition par rétrocontrôle : les neurones en vie inhibent la prolifération des précurseurs neuronaux. Lorsque ces neurones meurent, l'inhibition est levée. Les précurseurs prolifèrent pour former de nouveaux neurones.

Modèle d'activation directe : les neurones en dégénérescence stimulent la prolifération des précurseurs.

Ainsi, la bonne compréhension d'un tel mécanisme est primordiale pour l'étude de la régulation de la neo-neurogenèse.

II-4 : les cellules souches à la base du renouvellement neuronal

Durant de nombreuses années, le système olfactif périphérique a été considéré comme l'unique modèle de régénération neuronale chez l'adulte. En effet, il existait un dogme selon lequel il ne pouvait y avoir de renouvellement neuronal au sein du système nerveux central. Cependant, des études récentes ont montré qu'il existait une neurogenèse au niveau du système nerveux central de mammifères adultes. Deux zones particulières du cerveau montrent une neurogenèse chez l'adulte. Il s'agit de l'hippocampe et de la zone subventriculaire des ventricules latéraux. En effet, des cellules en prolifération ont été détectées au niveau de ces différentes zones (Rietze et al., 2000 ; Lois and Alvarez-Buylla, 1994). **Toutefois, l'accessibilité et la structure relativement simple du système olfactif en ont fait un modèle privilégié pour l'étude de la neurogenèse, qu'elle soit embryonnaire ou adulte.**

II-4-1 : les cellules souches de l'épithélium olfactif :

Comme nous l'avons précédemment vu, le système olfactif montre dans des conditions normales ou expérimentales un renouvellement neuronal continu tout au long de la vie. La présence de cellules olfactives capables, dans ces conditions, de produire de nouveaux neurones est donc indispensable. Sachant que les cellules capables de se diviser et de former par la suite de nouveaux neurones sont présentes dans la partie basale de l'épithélium (Moulton et Fink, 1972 ; Graziadei et Monti-Graziadei, 1979a). On peut donc supposer que les HBCs ou les GBCs correspondent aux cellules capables de générer de nouveaux neurones et sont des cellules souches olfactives.

II-4-1-1 : définition des cellules souches :

Le renouvellement continu des neurones au sein de l'épithélium olfactif implique la stimulation de cellules souches.

Les cellules souches possèdent plusieurs caractéristiques. Elles sont tout d'abord capables d'**autorenewement** et possèdent un caractère **indifférencié** c'est à dire qu'elles n'expriment pas les marqueurs spécifiques des cellules matures qui en sont issues. De plus, les cellules souches sont définies comme ayant un caractère **pluripotentiel**. En effet, ces cellules peuvent être à l'origine de différents types cellulaires ; par exemple les cellules souches neurales sont capables de produire à la fois des neurones mais également des astrocytes et des oligodendrocytes. Enfin, les cellules souches sont capables de **reconstituer un tissu endommagé**.

Il est toutefois à noter que les cellules souches ne produisent pas directement des cellules capables de se différencier en un type cellulaire particulier, mais qu'elles possèdent un lignage propre. En effet, la division d'une cellule souche peut être asymétrique, c'est à dire qu'elle aboutit à la formation d'une nouvelle cellule souche pluripotente et d'une cellule capable elle aussi de se diviser, mais étant déjà engagée vers un type cellulaire particulier. Ce type de cellules est appelé précurseur immédiat ou progéniteur. Le second type de division observé pour les cellules souches est la division symétrique. Elle permet soit uniquement le renouvellement de ces cellules, soit une différenciation des cellules issues de cette division en un type cellulaire particulier (Figure8).

Il est toutefois intéressant de noter que certaines cellules souches ont la capacité d'être quiescentes. En effet, les cellules souches quiescentes ne prolifèrent pas et seul un stimulus est capable d'activer leur division.

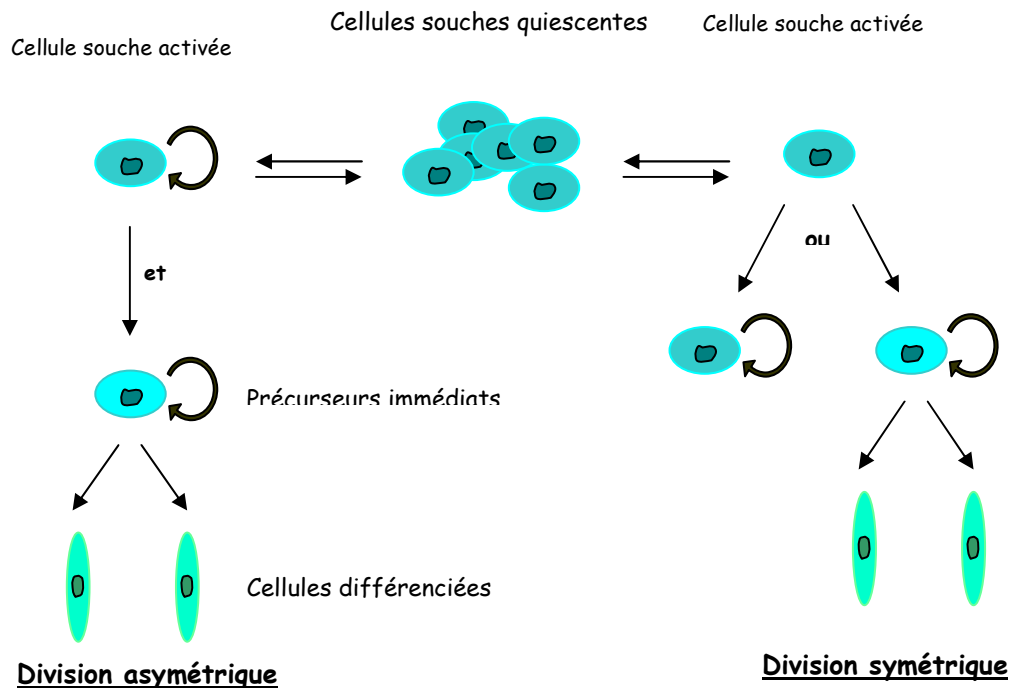


Figure8: les différents mode de division de cellules souches ; **Division asymétrique :** Lors de chaque division, une cellule souche va donner une nouvelle cellule souche et un précurseur immédiat. **Division symétrique :** lors de chaque division, une cellule souche donne soit deux nouvelles cellules souches soit deux précurseurs immédiats.

II-4-1-2 : identité des cellules souches du système olfactif

La connaissance du lignage des cellules olfactives, et donc de l'identité des cellules souches est indispensable pour une meilleure compréhension du mécanisme de la neurogenèse tout au long de la vie d'un individu. De nombreuses équipes se sont donc intéressées à l'identification précise des cellules souches résidant au sein de l'épithélium olfactif.

❖ Les cellules basales globulaires

L'incorporation de thymidine tritiée (Graziadei and Graziadei, 1979a ; Schwartz Levey et al., 1991) ainsi que des études portant sur la neurogenèse olfactive *in vitro* (Calof et Chikaraishi, 1989) semblent indiquer que parmi la population des cellules

basales globulaires se trouvent des précurseurs immédiats. Il s'agirait donc de cellules capables de se diviser mais déjà engagées vers la lignée neuronale. De plus, l'injection d'un rétrovirus permettant de suivre le lignage d'une cellule particulière montre que les neurones marqués sont directement issus des cellules basales globulaires (Caggiano et al., 1994 ; Schwob et al., 1994).

Cependant, on distingue dans l'ensemble des cellules basales globulaires deux sous-populations selon qu'elles expriment ou non un gène particulier.

En effet, une partie des cellules basales globulaires, peu abondante, exprime le gène *Mash-1* (mouse achaete scut homologue). Ce gène est un gène dit proneuronal qui est exprimé entre autre au niveau de cellules très précoces du lignage neuronal (Guillemot et al., 1993). Il code un facteur de transcription à motif hélice-boucle-hélice. Les cellules globulaires exprimant ce gène au sein de l'épithélium olfactif semblent être des cellules capables de se diviser. Cette activité de prolifération associée à l'expression d'un gène proneuronal semble aller en faveur de l'idée que les cellules globulaires pourraient être les précurseurs immédiats du lignage olfactif. Cependant, la division de ces cellules en réponse à une stimulation mitogénique est caractéristique d'une division symétrique et non de la division asymétrique le plus souvent rencontrée chez les cellules souches (Caggiano et al., 1994). Les cellules *Mash 1+* ne sont sans doute pas de réelles cellules souches. Elles semblent être au sein du lignage en amont des neuroblastes mais en aval des cellules souches. En effet, le knock-out de ce gène entraîne une réduction importante du nombre de neurones olfactifs formés durant le développement mais pas leur absence totale (Guillemot et al., 1993). On peut donc penser qu'il existe au moins deux voies de différenciation des cellules souches olfactives, l'une impliquant *Mash 1*, l'autre non (Cau et al., 2002).

D'autre part, l'expression spatio-temporelle du gène de la neurogénine 1 par une seconde population de cellules globulaires va dans le sens de cette hypothèse (Cau et al., 1997). En effet, la neurogénine-1 code un facteur de transcription possédant ainsi

un motif hélice-boucle-hélice. Ce gène est défini comme un gène de la neurogenèse faisant partie de la famille des gènes « *atona* » exprimés par des précurseurs déjà engagés dans une voie de différenciation neuronale (Bertrand et al., 2002). De plus, la transcription du gène de la neurogénine-1 serait activée par le facteur de transcription Mash-1 (Gordon et al., 1995, Cau et al., 1997).

Il semble donc que l'expression du gène Mash-1 soit suivie par l'expression du gène de la neurogénine-1 avant que le processus de différenciation neuronale ne soit mis en place.

Les études sur les cellules olfactives *in vitro* menées par le groupe de Calof semblent être en accord avec les résultats obtenus *in vivo*. En effet, cette équipe a réussi à mettre en culture des cellules nommées CFUs (Colony forming units). Ces cellules possèdent toutes les caractéristiques des cellules souches. Cependant, il n'existe aucun marqueur exclusif des cellules souches qui puisse être utilisé pour les caractériser *in vivo*. De plus, les études concernant l'auto-renouvellement des CFUs n'ont pu excéder deux semaines (Mumm et al., 1996). Il semble en fait que les cellules souches olfactives donneraient naissance aux précurseurs neuronaux exprimant Mash 1. Ces dernières cellules se divisent une à deux fois pour donner naissance aux précurseurs neuronaux immédiats (INP), eux même capables de se diviser une à deux fois *in vitro* (environ 17 heures entre chaque division) pour donner naissance aux neuroblastes. Ceux-ci se différencieront en neurones olfactifs matures (Gordon et al., 1995).

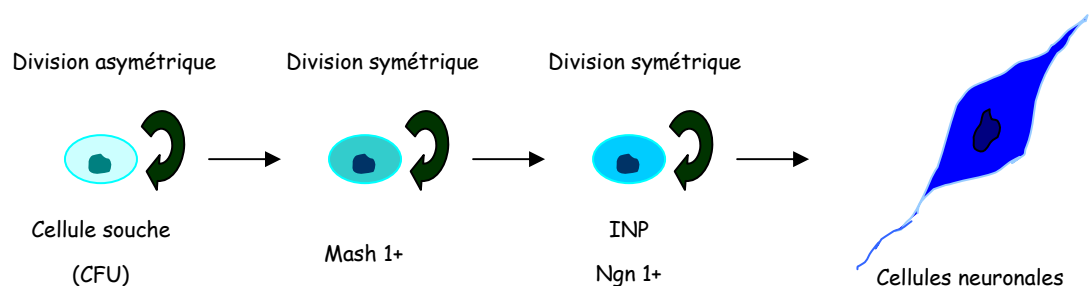


Figure9: Lignage neuronal olfactif selon Mumm et al., 1996

On peut donc en déduire que les cellules identifiées par le groupe de Calof comme exprimant Mash 1 et les INPs seraient en fait les deux sous-types de cellules basales globulaires précédemment décrits. **Les cellules basales globulaires pourraient donc correspondre aux cellules souches du système olfactif à condition qu'il existe un troisième type de cellules globulaires relativement indifférenciées c'est à dire n'exprimant ni Mash 1 ni la neurogénine 1.**

❖ Les cellules basales horizontales

Le second candidat pour les cellules souches olfactives, sont, du fait de leur localisation, les cellules basales horizontales. En effet, tout comme les cellules globulaires, elles sont situées dans la partie basale de l'épithélium, partie où sont supposées se trouver les cellules souches olfactives.

L'hypothèse selon laquelle les cellules souches olfactives seraient les cellules basales horizontales est basée sur la localisation des cellules souches présumées au sein de l'épithélium. En effet, d'après certaines études, elles seraient localisées au niveau de l'épithélium entre les cellules horizontales et les cellules globulaires (Graziadei and Graziadei, 1979a).

Il n'existe actuellement aucune preuve concrète de la fonction des cellules horizontales dans le lignage neuronal, des études principalement réalisées *in vitro*, ont permis d'obtenir des indices quant au rôle de ces cellules. Les HBCs ont pour principale caractéristique, outre leur localisation, d'être des cellules exprimant la kératine chez les rongeurs. La présence dans ces cellules d'une telle protéine en fait un excellent marqueur. Ainsi lors d'étude *in vitro*, les cellules horizontales se différencient le plus souvent des cellules globulaires par leur expression de kératine. Plusieurs observations ont pu être faites concernant le rôle de ces cellules. Il semblerait en effet qu'*in vitro*,

les cellules horizontales puissent donner des cellules basales globulaires. D'autre part, une lignée cellulaire dérivant de l'épithélium olfactif a pu être établie. Les cellules composant cette lignée ont des caractéristiques similaires aux cellules horizontales et sont capables de générer de nouveaux neurones (Sato et Takeuchi, 1995). De plus, ces cellules semblent posséder des caractéristiques identiques à celles des cellules souches (neuronales ou épithéliales) (Cotsarelis et al., 1989). En effet, elles ont un taux de prolifération relativement faible (Huard et Schwob, 1995, Holbrook et al., 1995). D'autre part, après une bulbectomie aboutissant à la perte de la plupart des neurones olfactifs matures, la prolifération des cellules globulaires est trois fois supérieure à la normale alors qu'aucun changement prolifératif n'est observé pour les cellules horizontales (Schwartz Levey et al., 1991). Pourtant lorsque l'épithélium d'une souris est lésé par du bromure de méthyle et donc que la majorité des cellules olfactives est détruite, la prolifération des cellules horizontales dans certaines zones de l'épithélium est activée (Schwob et al., 1995). De telles observations semblent correspondre à un processus similaire observé dans le foie. En effet, il est nécessaire de détruire ou d'inhiber la prolifération des précurseurs des cellules hépatiques pour observer une activation de la prolifération des cellules souches (Thorgeirsson, 1996). Une hypothèse impliquant les cellules horizontales dans le lignage des neurones olfactifs a été émise. Cependant aucune conclusion définitive ne peut être adoptée suite à ces expériences, car, les techniques utilisées dans ces différentes études sont pour la plupart basées sur la purification de cellules en culture, et aucune preuve directe de l'absence totale de GBCs dans ces cultures n'a pu être apportée.

Ainsi, il n'y a aucune preuve directe permettant d'affirmer que les cellules horizontales ou les cellules globulaires soient les cellules souches de l'épithélium olfactif, bien que de nombreuses études aient montré que les cellules globulaires font partie intégrante du lignage direct des neurones olfactifs alors qu'aucun rôle précis n'est attribué aux cellules horizontales.

❖ Deux courants opposés concernant l'identité des cellules souches

Sachant que l'identité des cellules souches olfactives n'est à ce jour pas connue deux courants concernant le lignage cellulaire au sein de l'épithélium olfactif s'opposent actuellement.

Le premier, et le moins suivi, consiste à dire que les cellules basales horizontales seraient en fait des cellules souches quiescentes qui nécessiteraient un signal exogène pour être activées. Elles seraient capables alors de donner les cellules globulaires, par division asymétrique, qui à leur tour donneraient naissance aux neurones (Figure10).

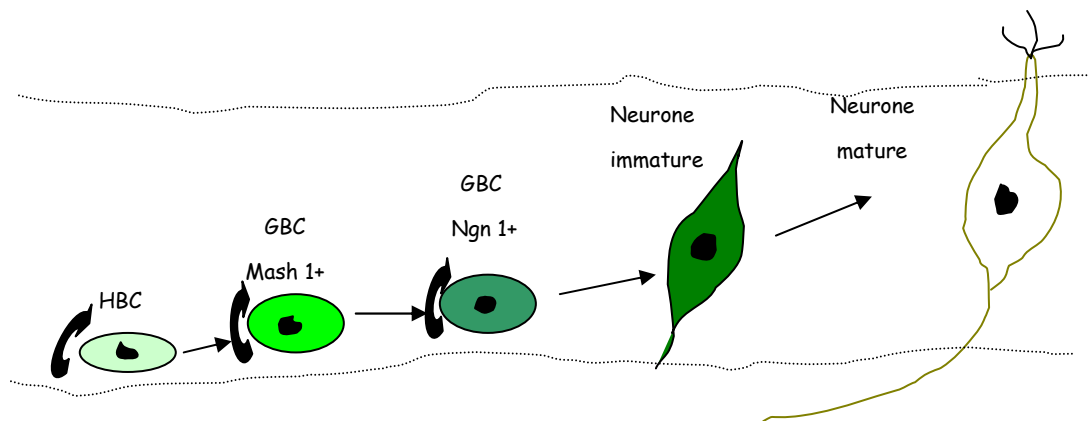


Figure10 : Hypothèse de lignage au sein de l'épithélium olfactif selon laquelle les cellules horizontales (HBC) seraient les cellules souches olfactives. Elles donneraient naissance aux cellules globulaires exprimant Mash 1+ (GBC Mash 1+) qui pourraient former elles mêmes les cellules globulaires exprimant la neurogénine 1 (GBC Ngn 1+).

La seconde hypothèse, et la plus soutenue, consiste à supposer que les cellules horizontales ne participeraient pas au lignage des neurones olfactifs. Dans ce cas l'identité des cellules souches reste inconnue et les cellules globulaires seraient en fait des précurseurs neuronaux. Des analyses effectuées sur un épithélium ayant été préalablement lésé au bromure de méthyle, montrent que des anticorps marquant généralement les cellules globulaires et les neurones, reconnaissent également spécifiquement des cellules ayant les caractéristiques des cellules horizontales ainsi que

des cellules de soutien durant les quelques jours qui suivent la lésion (Goldstein et Schwob, 1996). L'interprétation évoquée pour expliquer ces résultats serait que les cellules basales globulaires seraient capables de donner naissance aux cellules horizontales ainsi qu'aux cellules de soutien dans le cas où tous les types cellulaires doivent être reconstitués. Cette hypothèse sous-entend donc que les cellules globulaires seraient multipotentes (Figure11).

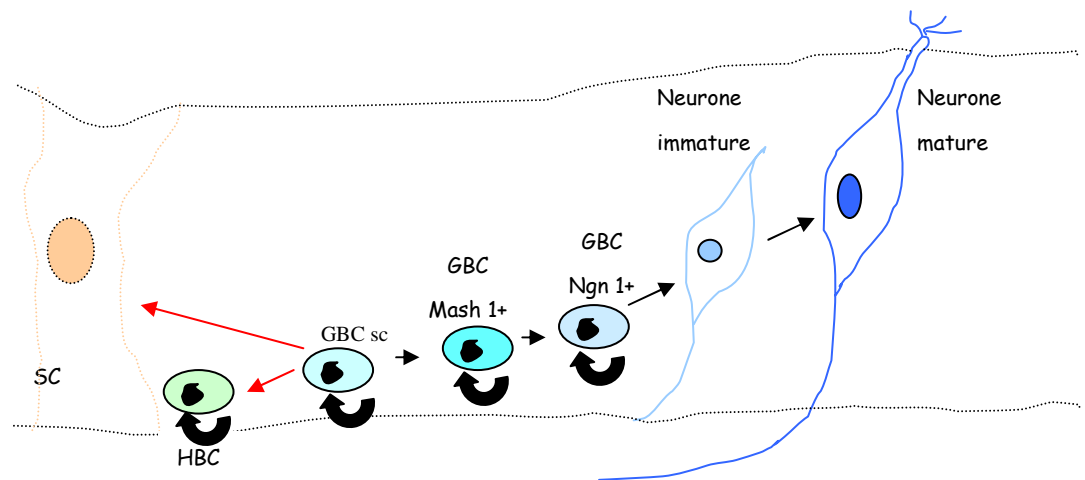


Figure11 : Hypothèse selon laquelle, parmi les cellules basales globulaires se trouveraient les cellules souches olfactives (GBC sc) capables de former les cellules horizontales (HBC), les cellules de soutien (SC) ainsi que les cellules globulaires exprimant Mash 1 (GBC Mash 1+). Ces dernières donneraient naissance aux cellules globulaires exprimant la neurogénine 1 (GBC Ngn 1+) capables de former des neurones immatures.

Du fait de ces deux hypothèses, il existe donc actuellement une controverse non résolue quand à l'identification exacte des cellules souches neurales de l'épithélium olfactif.

III- RÉGULATION DE LA NEUROGENÈSE AU SEIN DE L'ÉPITHÉLIUM OLFACTIF.

Le renouvellement neuronal de l'épithélium olfactif nécessite une forte régulation d'une part de l'activation des cellules souches, de manière à éviter la surproduction neuronale, mais également de la dégénérescence neuronale afin d'éviter une perte trop massive de neurones.

En fait, au sein de l'épithélium, la mort neuronale et la neurogenèse sont deux phénomènes qui sont étroitement liés afin de maintenir l'équilibre. Ainsi, tout neurone en dégénérescence est remplacé par un nouveau neurone. La régulation de tels processus, que ce soit la mort neuronale, la neurogenèse ou l'interaction entre ces deux phénomènes se doit d'être relativement fine. Ainsi, ces processus sont contrôlés par des phénomènes de sécrétions autocrines et/ou paracrines impliquant de nombreux facteurs de croissance. Ceux-ci doivent être capables de contrôler à la fois l'activation des cellules souches, la prolifération et la différenciation des précurseurs neuronaux ainsi que la survie des cellules en voie de différenciation ou des cellules matures. D'autre part, de nombreux facteurs de croissance doivent être impliqués dans le maintien de l'équilibre mort/survie ainsi que dans la régulation des migrations cellulaires et de la croissance axonale et dendritique.

Là encore, du fait de processus similaires à ceux observés au sein du système nerveux, l'épithélium olfactif est un modèle très accessible permettant de mieux comprendre l'implication des facteurs de croissance dans la neurogenèse.

L'étude faite ici sur les différents facteurs de croissance n'est pas exhaustive et représente les facteurs de croissance les plus souvent trouvés, que ce soit au sein de l'épithélium olfactif ou au sein du système nerveux.

III-1 : Les neurotrophines

Les neurotrophines sont les facteurs de croissance les plus étudiés. On peut distinguer, le NGF (nerve growth factor), le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), le NT-3 (neurotrophine 3) et le NT-4 (neurotrophine 4). Ces neurotrophines peuvent interagir avec deux classes différentes de récepteurs : les récepteurs dits de haute affinité TrK (Barbacid, 1994) et les récepteurs à faible affinité p75 (Puma et al., 1983 ; Meakin et Shooter, 1992). Il existe trois types de récepteurs à haute affinité, appelés Trk A, B et C qui reconnaissent respectivement le NGF, le BDNF et le NT4, et le NT3. Le récepteur à faible affinité p75 est toutefois capable de lier toutes les neurotrophines.

III-1-1 : expression des récepteurs à haute affinité au sein du système olfactif.

Dans l'épithélium olfactif de rat et de souris adulte, on observe un marquage par immunohistochimie en utilisant un anticorps anti-Trk A au niveau des cellules basales horizontales (Miwa et al., 1998a ; Roskams et al., 1996). Cependant même si après bulbectomie Trk A reste exprimé au sein des cellules horizontales, ce récepteur est également exprimé au niveau des neurones en régénération (Miwa et al., 1998a).

Les autres récepteurs à haute affinité semblent être exprimés uniquement au niveau des neurones. En effet, en immunohistochimie, le marquage anti-Trk C semble restreint à la surface et dans le tiers supérieur de l'épithélium (Roskams et al., 1996).

De telles observations permettent de conclure que les neurotrophines NGF, BDNF, NT3 et NT4 sont des facteurs de croissance agissant au niveau des cellules de l'épithélium olfactif.

III-1-2 : Fonction des neurotrophines au sein du système olfactif :

Bien que l'expression du NGF et de son récepteur dans le système olfactif ait été démontrée, très peu d'études *in vitro* se sont intéressées au rôle précis de cette neurotrophine. Des ARNm correspondant au NGF ont été détectés au sein des cellules périglomérulaires du bulbe olfactif adulte (Deckner et al., 1993 ; Guthrie et Gall, 1991). On pourrait alors supposer que le NGF synthétisé au niveau du bulbe agisse au niveau des cellules horizontales de l'épithélium olfactif ainsi qu'au niveau des cellules engainantes où est également exprimé le Trk A. De plus le NGF, le BDNF et le NT-3 induisent l'expression du facteur de transcription *cfos* au sein des neurones olfactifs dans des cultures primaires (Roskams et al., 1996). Ces observations sont en accord avec le motif d'expression de Trk B et Trk C au niveau des neurones olfactifs. Cependant l'action du NGF sur les neurones reste inexplicée puisque les seules cellules exprimant Trk A au sein de l'épithélium sont les cellules basales horizontales. L'ajout de BDNF et de NT-3 augmente le nombre de neurones immatures présents dans les cultures contrairement à l'ajout de NGF qui ne provoque aucun changement concernant le nombre et la survie des neurones en culture (Holcomb et al., 1995 ; Roskams et al., 1996). Cependant, dans les co-cultures de neurones et de cellules engainantes, l'ajout de NGF

provoque une importante diminution du nombre de neurones (Bakardjiev, 1997). Le NGF pourrait donc avoir un effet indirect sur la survie neuronale via les cellules engainantes connues pour exprimer p75.

De plus, le BDNF, le NT-3 et le NT-4 semblent avoir individuellement un effet anti-apoptotique sur une population donnée de neurones olfactifs *in vitro*, ce qui est en accord avec le fait que les Trk B et Trk C sont également exprimés par les neurones de cette sous-population (Holcomb et al., 1995). Le NT-3 semble être lui aussi un facteur de survie des neurones olfactifs. En effet au sein de co-culture *in vitro* d'épithélium et de bulbe, le contact neurone / bulbe est nécessaire à l'expression de Trk C par les neurones (Roskams et al., 1996). Et le fait que Trk C soit exprimé tardivement durant le développement suggère que le NT-3 provenant du bulbe olfactif pourrait agir comme un facteur de survie des neurones olfactifs. Des études dont les résultats sont en accord avec cette hypothèse ont montré que l'addition de NT-3 à du milieu de culture prévient l'apoptose des neurones les plus matures (Holcomb et al., 1995). Enfin et même si l'on suppose que le NT-3 agissant sur les cellules neurosensorielles provient du bulbe olfactif, aucun ARNm correspondant n'a pu être détecté à ce niveau.

III-2 : Les facteurs de croissance de la famille FGF

Les facteurs de croissance de la famille FGF (fibroblast growth factor) comportent au moins 18 membres (Ohbayashi et al., 1998). Le FGF basique (ou FGF2) et le FGF acide (ou FGF1) ont été les premiers à être caractérisés (Baird, 1994). Tous les membres de la famille FGFs reconnaissent avec une grande affinité au moins quatre récepteurs tyrosine kinases. Cependant, du fait de leur action physiologique, les FGFs doivent également reconnaître un récepteur à faible affinité qui est en fait une protéoglycane situé à la surface des cellules (Yayon et al., 1991).

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet des différents FGFs sur la neurogenèse de l'épithélium olfactif. Ainsi, on a pu observer qu'au niveau d'une lignée

cellulaire provenant d'un épithélium humain, il existe une production endogène de FGF2. Ce facteur de croissance est donc supposé agir au niveau des cellules olfactives. En effet, l'apport exogène de FGF2 augmente de façon tout à fait significative la prolifération cellulaire observée au sein de l'épithélium (Ensoli et al., 1998). Sur des lignées cellulaires provenant d'épithélium de rat, le FGF2 augmente la prolifération cellulaire (Goldstein et al., 1997). Des effets similaires sont observés au niveau de cultures semi dissociées d'épithélium olfactif d'embryon de souris où le FGF2 augmente la prolifération des cellules non-neuronales (De Hamer et al., 1994). Il est important de noter que parmi tous les FGFs testés, FGF2 est le facteur de croissance majeur même si FGF1, FGF4 et FGF7 ont aussi un effet positif sur le taux de prolifération (De Hamer et al., 1994). Sur des cultures d'explants d'épithéliums olfactifs prélevés chez rat et chez l'humain, l'addition de FGF2 induit la différenciation (Mac Donald et al., 1996). Toutefois, il a été montré que dans des cultures primaires, le FGF2 stimulait la prolifération des cellules basales globulaires et donc augmentait le nombre de précurseurs neuronaux. Cependant ce facteur de croissance ne semble pas induire directement la différenciation (Newman et al., 2000).

En résumé, les résultats de ces différentes études renforcent l'hypothèse selon laquelle: **le FGF2 exercerait un effet mitotique sur les précurseurs neuronaux présents au sein de l'épithélium.** Les précurseurs neuronaux, c'est-à-dire les cellules basales globulaires, et les neurones expriment le récepteur à haute affinité du FGF2 (De Hamer et al., 1994 ; Ensoli et al., 1998 ; Newman et al., 2000). De plus, le FGF2 ne semble avoir aucun effet sur la différenciation neuronale et semble au contraire l'inhiber (De Hamer et al., 1994 ; Goldstein et al., 1997 ; Newman et al., 2000).

D'autre part, bien que le FGF1 puisse avoir un effet de stimulation au niveau de cultures de cellules olfactives (De Hamer et al., 1994), il n'est pas présent de manière endogène au sein de l'épithélium (Key et al., 1996).

En conclusion, l'effet mitogénique du FGF2 sur les cellules de l'épithélium olfactif est identique à celui observé sur les cellules du système nerveux central. Par exemple, ce facteur de croissance est capable de stimuler la prolifération des précurseurs des neurones à dopamine chez l'embryon (Mayer et al., 1993), des précurseurs embryonnaires des cellules gliales (Engele et Bohn, 1992) et des précurseurs multipotents isolés du cerveau d'une souris adulte (Gritti et al., 1996, Richards et al., 1992).

Aucune étude fonctionnelle sur le rôle des FGFs dans le bulbe olfactif n'a été réalisée. Néanmoins, l'importance de ce facteur de croissance dans la formation de nouveaux neurones dans la zone des ventricules a été montrée. De plus, l'ARNm codant le récepteur au FGF1 a pu être détecté au niveau de cellules souches présentes dans la zone ventriculaire d'un cerveau adulte (Gritti et al., 1999 ; Vescovi et al., 1993). En réponse au FGF2, ces cellules vont proliférer (Gritti et al., 1999) et produire deux types de précurseurs: un précurseur neuronal unipotent et un précurseur bipotent pouvant par la suite former à la fois des neurones et des cellules gliales (Vescovi et al., 1993). Enfin, la mutation du gène codant un récepteur au FGF serait responsable de l'une des formes génétiques de la maladie de Kallmann de Morsier se traduisant notamment par une anosmie due à un défaut de morphogenèse du système olfactif (Soussi-Yanicostas communication personnelle).

III-3 : les facteurs de croissance de la famille EGF :

Le récepteur de la famille EGF (Epidermal growth factor) est inclus dans la famille des récepteurs à tyrosine kinases (Carpenter, 1983). Les autres membres sont les récepteurs ErbB-2, ErbB-3 et ErbB-4 (Baulida et al., 1996 ; Riese et al., 1996). Les ligands de ces récepteurs sont respectivement EGF (epidermal growth factor), TGF α (transforming growth factor- α), l'amphiréguline et la famille des neurégulines.

L'EGF et le TGF α semblent stimuler la prolifération des cellules basales horizontales dans les organo-cultures d'épithélium olfactif embryonnaire (Farbman et al., 1994, Farbman et Buchloz, 1996). Toutefois, la prolifération des cellules basales horizontales est plus sensible au TGF α qu'à l'EGF (Farbman et al., 1994 ; Farbman et Buchloz, 1996). De telles observations ont également été vérifiées lors de l'étude de la prolifération des cellules de soutien, régulée par ces deux facteurs de croissances. En effet, tout comme pour les HBCs, le TGF α stimule plus la prolifération des cellules de soutien que l'EGF (Farbman et Bucholz, 1996). L'effet activateur de la prolifération de l'EGF sur les cellules horizontales a également été observé au niveau de cultures d'épithélium d'embryons et de rats nouveaux-nés (Satho et Takeuchi, 1995). Des études biochimiques ont indiqué que ces deux facteurs de croissance pourraient avoir des effets différents au sein de l'épithélium *in vivo*. En effet, le TGF α , lorsqu'il est injecté dans la carotide, stimule l'activation des récepteurs EGFr, ErbB-2 et des MAPKinases alors que EGF stimule seulement l'activation du récepteur EGFr (Ezeh et Farbman, 1998). Toutefois, aucune stimulation des récepteurs ErbB-3 et ErbB-4 n'est observée en réponse à une induction par TGF α et EGF.

En comparaison, l'ARNm codant EGFr est exprimé par les cellules souches isolées des zones ventriculaires et EGF agit sur ces cellules comme un activateur de la prolifération (Gritti et al., 1999). Il est important de noter qu'au niveau des zones ventriculaires, à la fois EGF et FGF2 agissent sur la prolifération des cellules souches mises en culture (Gritti et al., 1999).

Il semblerait donc que TGF α et EGF agissent sur la prolifération des cellules basales horizontales tout comme EGF sur les cellules souches isolées des zones ventriculaires.

III-4: La famille des IGFs (insulin like growth factors)

La famille des IGFs est constituée de facteurs de croissance (insuline, IGF-1 et IGF2), de récepteurs (récepteur à l'insuline à IGF-1 et à IGF-2) et de protéines d'accrochage (IGFBPs 1-6).

Les récepteurs à l'insuline et à IGF-1 sont des protéines hétéro-tétramériques composées de deux domaines extracellulaires et de deux domaines intracellulaires à activité tyrosine kinase (Rechler et Nissley, 1990). Le récepteur à IGF-2 chez les mammifères, quant à lui, existe seulement sous une forme monomérique.

Le récepteur à IGF-1 aurait une plus forte affinité pour IGF-1 que IGF-2. Cependant, il est maintenant clairement établi que les effets de IGF-1 et IGF-2 dépendent du récepteur IGF-R-1 . Malgré tout, la cascade de signalisation activée par le récepteur à IGF-2 étant encore inconnue, il n'est pas exclu que ce récepteur soit également impliqué chez les mammifères dans le signal médié par IGF-2 (Nieslen et Gammeltoft, 1990).

Le système olfactif possède tous les composants des voies de signalisation médiées par les facteurs de croissance de la famille des IGFs. Ceci permet de suggérer qu' à la fois IGF-1 et IGF-2 joueraient un rôle important au niveau de l'épithélium et du bulbe olfactif. En effet, lorsqu'on introduit de l'IGF-1 dans la narine d'un rat nouveau-né, le nombre de cellules en prolifération et l'épaisseur de l'épithélium olfactif augmentent (Pixley et al., 1998). De plus, cet effet est indépendant des IGFBPs. L'ensemble de ces observations montre que IGF-1 aurait une action indirecte sur la prolifération des précurseurs neuronaux de l'épithélium, bien que le mécanisme exact de l'action de l'IGF reste encore méconnu puisque le récepteur IGF-R-1 ne semble exprimé qu'au niveau des neurones immatures et non au niveau des précurseurs (Pixley et al., 1998).

Par hybridation in situ sur des fœtus de rat les motifs d'expression d'IGF1 et 2 ont pu être mis en évidence. IGF1 est principalement exprimé dès le stade E13 dans les

deux couches des cellules mitrales et des glomérules et plus faiblement dans la région olfactive périphérique alors qu'IGF2 absent du bulbe est fortement exprimé dans les méninges, le nerf olfactif, la sous muqueuse olfactive et les capsules cartilagineuses des cornets nasaux (Ayer-Le Lièvre et al., 1991). L'expression d'IGF1 dans le bulbe serait maintenue après la naissance (Rotwein et al., 1988) ainsi que chez l'adulte (Werther et al., 1990).

Chez le poulet, l'expression d'IGF-R-I à la périphérie du système olfactif est extrêmement précoce, elle est en fait détectée dans la placode olfactive dès le stade 3-4 jours (Holzenberger et al., 1996). Au contraire, l'expression d'IGFI n'a été mise en évidence que dans le bulbe olfactif dans la couche des cellules mitrales à partir du stade de 8-9 jours correspondant à la morphogenèse bulbaire et au début de la synaptogenèse périphérocentrale des axones neurosensoriels avec les cellules mitrales (Holzenberger et al., 2000). Les conditions d'un rôle d'IGFI en tant que facteur neurotrophe dans les interactions entre les neurones olfactifs et leur cellules cibles se trouvent ainsi remplies.

IGF-1 jouerait également un rôle important lors de la formation du bulbe olfactif. La preuve la plus directe concernant cette hypothèse est vérifiée par le fait que la taille du bulbe olfactif est considérablement réduite chez une lignée de souris IGF^{-/-}. On peut également y observer une perte significative du nombre de cellules dans la couche des cellules mitrales (Beck et al., 1995). Cet effet ne semble cependant pas en accord avec ce qui est observé lorsqu'un antisérum pour IGF-1 est ajouté à une culture de bulbe olfactif. La réduction de l'activité de IGF-1 augmente de manière significative la croissance du bulbe. On peut alors supposer que l'effet de IGF-1 sur le bulbe olfactif est dose-dépendant (Giacobini et al., 1995). Il pourrait également y avoir une interaction avec IGF2 qui interagit avec le même récepteur et est exprimé dans l'environnement direct du télencéphale.

III-5 : Les facteurs de croissance de la super famille TGF β .

25 molécules divisées en plusieurs sous-familles composent la famille des TGF β (transforming growth factor β). Parmi les membres de cette grande famille, on trouve TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 et les TGF β 4 et TGF β 5 qui sont les homologues du TGF β 1 chez le poulet (Burt et Paton, 1992). Les facteurs de croissance BMP2 et BMP4 font également partie de cette famille mais appartiennent à une autre sous-famille que celle des TGF β s.

Ces molécules agissent par fixation aux récepteurs sérine-thréonine kinase de types I et II (Massague, 1996 ; Ten Dijke et al., 1998). La présence simultanée de ces deux récepteurs est nécessaire à l'action des TGF β et des BMPs, et le ligand doit se fixer à ces deux récepteurs pour avoir une action. Il se forme alors un complexe hétéromérique permettant la phosphorylation des récepteurs et donc la transmission intracellulaire du signal. Des complexes différents peuvent entraîner différentes réponses intracellulaires. Il est également important de noter que les récepteurs aux TGF β s sont spécifiques des facteurs de croissance de la sous-famille des TGF β contrairement aux BMPs qui sont capables de se fixer à la fois aux récepteurs aux BMPs mais aussi aux récepteurs de l'activine. (Massague, 1996, Ten Dijke et al., 1998).

Il existe relativement peu de données concernant l'expression de ces facteurs de croissance et de leurs récepteurs au niveau du système olfactif. Seul l'ARNm codant le TGF β 2 a pu être détecté au niveau de l'épithélium embryonnaire de l'organe voméronasal. Cependant le transcrite de TGF β 3 est détecté au niveau du bulbe olfactif et plus particulièrement au niveau des cellules mitrales (Pelton et al., 1990). **Ainsi le bulbe olfactif aurait la capacité de synthétiser le TGF β 3.**

L'action de certains de ces facteurs de croissance reste encore l'objet de nombreuses controverses. En effet, TGF β 2 induit la différenciation neuronale au sein

de cultures d'épithélium olfactif de rats nouveau-nés, la cible envisagée semblant être les cellules basales horizontales (Mahanthappa et Schwarting, 1993). Des résultats similaires ont été obtenus après stimulation de cultures d'explants d'épithélium embryonnaire et d'une lignée cellulaire de cellules horizontales par TGF β 2. Dans ce type d'expérience, ce facteur de croissance stimule la différenciation et induit l'expression du marqueur neuronal N-CAM (Sato et Takeuchi, 1995). Ainsi, il a été supposé que TGF β 2 induisait la différenciation des cellules horizontales en neurones (Mahanthappa et Schwarting, 1993 ; Sato et Takeuchi, 1995). Cependant, la controverse existant en ce qui concerne l'appartenance des cellules horizontales au lignage des neurones remet en cause cette hypothèse. En effet, dans les expériences décrites ci dessus, les cellules horizontales ont été identifiées par leur expression de kératine, mais aucun marqueur des cellules globulaires n'a été recherché pour exclure leur présence. D'autre part, les cultures utilisées contiennent une proportion significative de cellules épithéliales et de cellules nonépithéliales. De plus, il semblerait que la plupart des cellules meurent durant les observations (Sato et Takeuchi, 1995). Ainsi il a été envisagé, par les équipes renforçant l'hypothèse que les cellules horizontales sont hors lignage neuronal, que TGF β 2 agirait plutôt au niveau des cellules globulaires ou agirait indirectement *via* les neurones ou les cellules non-épithéliales présentes dans ce type de cultures. Enfin, des études récentes semblent corroborer cette hypothèse. L'action du TGF β 2 sur la différenciation neuronale semble être facilitée par FGF2, or celui-ci active la prolifération des cellules basales globulaires. Enfin, le récepteur au TGF β 2 est exprimé par les cellules globulaires ce qui semblerait confirmer le fait que ce facteur de croissance interviendrait plutôt sur les GBCs que sur les HBCs (Newman et al., 2000). Il n'est toutefois pas exclu que TGF β 2 ait d'autres actions dans l'épithélium olfactif où il pourrait par exemple intervenir dans le processus mort cellulaire.

Les BMPs pourraient réguler la prolifération ou la survie des cellules basales globulaires (Mackay-Sim et Patel, 1984). En effet, il apparaît que la prolifération des cellules basales est en relation avec la densité de neurones immatures présents au sein

de l'épithélium olfactif. De manière identique, la prolifération *in vitro* des précurseurs neuronaux est inhibée par la co-culture de neurones (Mumm et al., 1996). Cette inhibition de la neurogenèse est reproduite lorsque BMP2, BMP4 et BMP7 sont ajoutés aux cultures de cellules épithéliales et semble concomitante à la disparition des progéniteurs précoces (Shou et al., 1999). Enfin, BMP4 semble être le facteur de croissance qui possède un rôle central dans l'interaction neurogenèse mort neuronale (cf II-3).

III-6 : Vue générale de l'action des facteurs de croissance sur les cellules de l'épithélium olfactif :

Les différentes études décrites ci-dessus, montrent d'une part la grande variété de facteurs de croissance présents au niveau du système olfactif et d'autre part soulignent la complexité des mécanismes mis en jeu dans la régulation de la neurogenèse, de la différenciation et de la survie cellulaire.

Cependant, le rôle de tous les facteurs de croissance n'est à ce jour pas entièrement élucidé. Seules des études concernant l'expression de ces facteurs et de leurs récepteurs ont jusqu'à présent permis d'émettre certaines hypothèses vérifiées ou non par des études *in vitro*.

En conclusion, il semblerait qu'au niveau de l'épithélium olfactif, EGF, TGF α et FGF2 stimulent la prolifération des cellules basales. Cependant, de nombreuses controverses existent concernant la cible et le rôle de ces facteurs. D'autre part, l'expression du récepteur Trk A par les cellules basales horizontales permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle NGF aurait une action au niveau de ces cellules.

IGF-1 semble stimuler la prolifération cellulaire de l'épithélium en interaction avec le FGF2 (Pixley et al., 1998), mais il semblerait que ce facteur ait plutôt un rôle au niveau de la différenciation neuronale. En effet, le mucus contiendrait de la dopamine (Lucero et Squires, 1998) et de l'IGF-1 (Frederico et al., 1999) et cette dopamine induirait la différenciation des neurones olfactifs *in vitro* et *in vivo* (Coronas et al., 1997, Féron et al., 1999).

Enfin, les BMPs semblent inhiber la prolifération des précurseurs neuronaux (Mumm et al., 1996 ; Shou et al., 1999) alors que le TGF β 2 entraîne plutôt une stimulation de la différenciation des cellules basales globulaires (Mahanthappa and Schwarting, 1993 ; Satoh et Takeuchi, 1995 ; Newman et al., 2000).

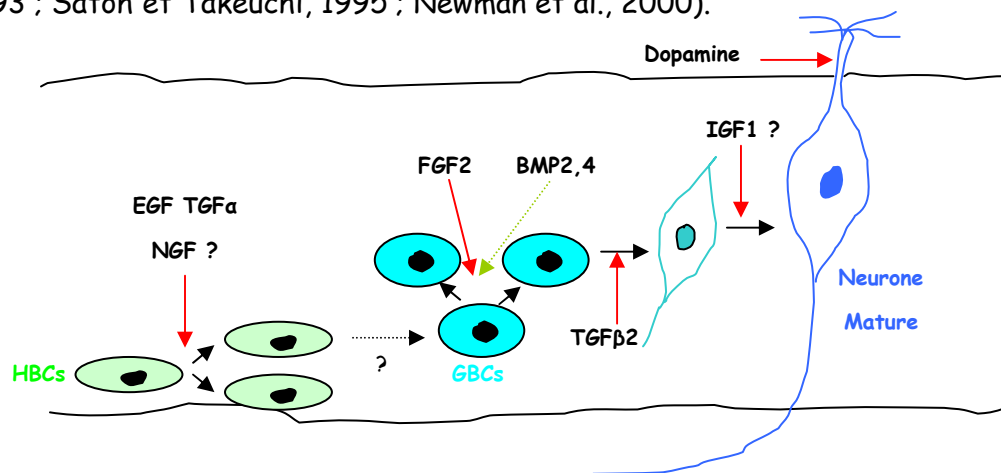


Figure12 : Schéma général de l'action de certains facteurs de croissance au cours du lignage des cellules de l'épithélium olfactif. (\rightarrow) indique une stimulation de la prolifération ou de la différenciation. ($\cdots\rightarrow$) indique une inhibition de la prolifération.

Bien que cette liste de facteurs de croissance ne soit pas complète, elle permet de mieux comprendre les phénomènes régissant la régulation de la neurogenèse, la différenciation et la survie au sein de l'épithélium. La majorité de ces facteurs est produite par le bulbe. **Le bulbe olfactif peut donc être considéré comme la principale source trophique des neurones de l'épithélium dont il est la cible. Toutefois certains de ces facteurs sont aussi produits par les cellules engainantes et les cellules de la sous muqueuse ce qui permet d'envisager un rôle complémentaire de l'environnement proche des cellules de la lignée neuronale olfactive.**

IV : CELLULES SOUCHES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL ET CELLULES SOUCHES OLFACTIVES

IV-1 : Les cellules souches du système nerveux central

Les cellules souches neurales du système nerveux central possèdent les caractéristiques communes à l'ensemble des cellules souches. Elles sont capables d'autorenouvellement à chacune de leurs divisions et de produire les cellules de tous les lignages coexistant dans le tissu où elles sont localisées. Ainsi, dans le cas du système nerveux central, les cellules souches neurales sont capables de produire aussi bien des neurones que des astrocytes ou des oligodendrocytes.

En réponse à un signal spécifique, les cellules souches vont produire différentes cellules progénitrices qui vont perdre leur liaison à la membrane basale et rapidement migrer vers les différentes couches du cortex. La plupart du temps, les cellules souches neurales se divisent de façon asymétrique et produisent des précurseurs immédiats qui migrent loin des zones périventriculaires (Morrison et al., 1997 ; Panicker et Rao, 2000).

Des cellules souches neurales ont pu être isolées à partir de diverses zones du cerveau embryonnaire et adulte tel que l'hippocampe et les zones périventriculaires, et plus récemment au niveau du cortex et des amygdales (Carpenter et al., 1999 ; Vescovi et al., 1999 ; Johansson et al., 1999 ; Uchida et al., 2000 ; Arsenijevic et al., 2001).

Il est toutefois important de noter que les cellules souches adultes dérivent des cellules souches neurales embryonnaires ; mais leurs caractéristiques

diffèrent de celles des cellules souches du neuro-épithélium. (Ciccolini et Svendsen, 1998 ; Roy et al., 2000). En effet la forme la plus précoce du tube neural est constituée de cellules proliférantes et morphologiquement identiques appelées cellules souches neuroépithéliales (Kalyani et al., 1997). Ces cellules sont initialement présentes dans une seule couche d'un épithélium pseudo stratifié qui tapisse toutes les cavités cérébrales embryonnaires. La principale différence entre les cellules souches adultes et les cellules souches embryonnaires est que les cellules souches adultes sont quiescentes et qu'elles expriment la GFAP(Glial fibrillary acid protein) qui est un marqueur spécifique des cellules gliales différenciées (pour revue Alvarez Buylla et al., 2001).

IV-2 : Similarités entre les cellules souches du système olfactif et du système nerveux central.

De nombreuses similarités existent entre les cellules souches du système nerveux central et les cellules souches olfactives. Les plus nombreuses concernent la régulation de la neurogenèse.

En effet, au niveau de l'épithélium olfactif, EGF, TGF α et FGF2 stimulent la prolifération des cellules basales. FGF2 induit la division des cellules basales globulaires, donc des précurseurs, alors que EGF et TGF α induisent plutôt la division des cellules basales horizontales. Dans le système nerveux embryonnaire et adulte, EGF et FGF2 sont considérés comme des régulateurs précoces de la neurogenèse. Dans les embryons, FGFr-4 et FGFr-2 sont exprimés dans les cellules indifférenciées du neuroépithélium alors que FGFr-1 est exprimé à la fois au niveau de cellules indifférenciées et des neurones matures (Kalyani et al., 1999). De plus, les cellules souches qui atteignent très précocement le télencéphale sont sensibles à FGF2, alors que celles qui atteignent cette zone plus tardivement répondent à une stimulation par

EGF. De telles observations permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle il existe deux types de cellules souches multipotentes dans les zones germinales embryonnaires (Tropepe et al., 1999). Les cellules isolées du striatum d'embryon de souris expriment le récepteur à EGF (Reynolds et al., 1992) et leur prolifération est stimulée par EGF et TGF α (Reynolds et al., 1992). D'autres études suggèrent que FGF2 permettrait aux précurseurs neuronaux du striatum embryonnaire de devenir sensibles à l'action de EGF *in vitro* (Ciccolini et Svendsen, 1998). Ces cellules expriment FGF $r1$ et FGF2 induit la prolifération des précurseurs neuronaux et gliaux (Gritti et al., 1999). De plus, les cellules multipotentes présentes dans la zone periventriculaire d'un cerveau adulte sont sensibles à la fois à l'action proliférative de EGF et de FGF2 qui agissent en synergie (Gritti et al., 1999). De manière identique, EGF et FGF2 induisent la prolifération de cellules souches multipotentes présentes dans la moelle épinière et dans les ventricules (Weiss et al., 1996). Enfin, les précurseurs présents au niveau du neuroépithélium de la moelle épinière humaine se divisent *in vitro* après stimulation par EGF et FGF2.

Finalement, dans les autres zones du système nerveux central, il a été clairement établi que l'action des facteurs de croissance, et donc la présence d'une source trophique, jouait un rôle primordial dans la survie neuronale. Comme pour l'ensemble de ces neurones, au cours du développement les neurones olfactifs sont produits en abondance puis leur nombre est considérablement réduit par apoptose.

Ainsi, la neurogenèse olfactive semble avoir de nombreux points communs avec la neurogenèse du système nerveux central. Du fait de sa facilité d'accès, l'étude de la neurogenèse au niveau de l'épithélium olfactif est donc intéressante pour mieux comprendre l'ensemble des phénomènes communs gérant ces processus. Il est toutefois important de ne pas négliger que quelques différences même mineures existent entre ces deux types de neurogenèse.

But du travail

But du travail

Le modèle aviaire est un modèle de choix pour l'étude de la neurogenèse et de la mort neuronale. En effet, le poulet possède un système olfactif relativement simple, et son embryon est facilement accessible. De plus, du fait de la morphologie du système olfactif chez les oiseaux, l'épithélium olfactif est lui aussi relativement facile d'accès. C'est ainsi que des électro-olfactogrammes ont pu être réalisés au laboratoire sur des épithéliums olfactifs de poulet, chez l'embryon et le poussin. Ce système offre donc un moyen privilégié pour entreprendre des études expérimentales visant à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires gouvernant la neurogenèse olfactive.

Chez le poulet, contrairement aux mammifères, le nerf olfactif est relativement long et superficiel. Une dégénérescence massive suivie d'une neurogenèse accrue peut donc être réalisée par section du nerf olfactif tant chez l'embryon *in ovo* que chez le poussin. Ceci, nous a permis d'étudier certains aspects du renouvellement neuronal olfactif stimulé massivement par section du nerf. L'analyse comparée des phénomènes de dégénérescence et de régénération a été effectuée chez l'embryon et l'adulte après axotomie. Les conséquences de la lésion ont été étudiées par des techniques de détection d'apoptose et de prolifération cellulaires. Puis l'action de l'IGF-1 après section du nerf, a été analysée. Des techniques permettant d'observer la différenciation cellulaire ont alors été utilisées.

En raison de l'absence de marqueurs spécifiques des cellules qui coexistent au sein de l'épithélium olfactif aviaire, nous avons cherché, dans un second temps, à identifier des marqueurs potentiels de chaque type cellulaire. D'une part nous nous sommes basés sur des marqueurs existant chez d'autres espèces et d'autre part nous avons cherché à caractériser de nouveaux marqueurs. Ainsi dans l'espoir d'isoler de

nouveaux gènes impliqués dans les processus de néo-neurogenèse et de mort neuronale, nous avons choisi la technique de « differential display » ou DDRT. Cette technique est basée sur l'expression différentielle de gènes dans deux conditions expérimentales ou physiologiques différentes. Dans notre cas, nous avons comparé les gènes exprimés au temps T0 c'est à dire sans section du nerf et les gènes exprimés 24 heures après la lésion.

Les marqueurs obtenus ont pu être utilisés pour la suite de notre étude. En effet, de manière à mieux comprendre les processus gouvernant la neurogenèse au sein de l'épithélium olfactif, nous avons isolé les cellules souches du système olfactif par la technique de FFF (Flux Flow Fractionation). Cette technique de tri cellulaire est basée sur la morphologie des cellules et est relativement peu agressive facilitant ainsi la mise en culture des cellules triées. La caractérisation de ces cellules a ensuite été réalisée par immunohistochimie (utilisant les différents marqueurs isolés précédemment) et par hybridation *in situ*. La réponse de ces cellules à divers traitements et conditions de culture a pu être étudiée afin de connaître les conditions favorisant la survie, la multiplication ainsi que la stimulation ou le blocage de la différenciation de ces cellules. Enfin, la pluripotentialité de ces cellules souches présumées a été testée par greffes au niveau du système nerveux central de poulet (embryon et adulte). Les résultats de cette étude sur le modèle aviaire servent actuellement pour un travail visant à définir le conditionnement des cellules souches neurales olfactives humaines en vue d'autogreffes à but thérapeutique.

En résumé, l'ensemble de cette étude a abordé les différents processus existant au sein du tissu olfactif c'est à dire le renouvellement cellulaire, l'activation des cellules souches et leur différenciation.

Matériels et méthodes

I MATÉRIEL BIOLOGIQUE

I-1 : Modèle animaux

Afin de réaliser nos expériences, nous utilisons deux types d'embryons d'oiseau, l'embryon de poulet (*Gallus gallus linne*) et celui de caille (*Coturnix coturnix japonica*). Les œufs fécondés proviennent d'élevages commerciaux (Grenaille Lot, Chanteloup Ille et Vilaine, Roumazielles, Haute-Vienne). La race des poulets utilisée pour notre étude est une race hétérozygote pour le gène « cou nu », sélectionnée par l'INRA.

Les œufs fécondés sont stockés dans une étuve à température constante 15°C. Pour les expériences , ils sont incubés à 38°C dans une couveuse (Maino, Italie) en atmosphère humide afin d'assurer le meilleur développement possible des embryons.

Les tables de Hamburger et Hamilton (H&H) (1952) pour le poulet et celles de Zacchei (1961) pour la caille permettent de déterminer le stade de développement des embryons. Cependant, pour les stades précoces (stade 7 à 17 H&H, 1 à 2,5j), le nombre de somites donne une évaluation plus précise. Alors qu'après le 10ème jour d'incubation et ceci jusqu'à l'éclosion qui se situe normalement au 21ème jour chez le poulet et au 16ème chez la caille, on préfère évaluer les stades en nombre de jours d'incubation.

I-2 : Cellules humaines

Les cellules humaines sont obtenues à partir de fragments d'épithélium olfactifs sains issus de déchets chirurgicaux. Ces fragments nous sont fournis de manière stérile, condition conservée pour leur utilisation ultérieure.

II- Expérimentations *in vivo* et *in vitro* :

II-1 Lésions

II-1-1 Axotomies

Les axotomies sont effectuées chez l'embryon au 16^o jour d'incubation à l'aide d'instruments de micro chirurgie stérilisés (MORIA, France). Le facteur de risque le plus important lors de ce genre d'opération étant la rupture de vaisseaux chorio-allantoïdien qui déclenche une hémorragie difficilement contrôlable et fatale pour l'embryon. Seul le nerf droit est sectionné. Le nerf gauche est préservé et sert donc de contrôle pour les analyses. Les embryons survivants sont sacrifiés toutes les 3 heures au cours des trois jours suivants. La mortalité opératoire atteint environ 70%. Le protocole opératoire utilisé a été décrit en détails dans la publication N°1.

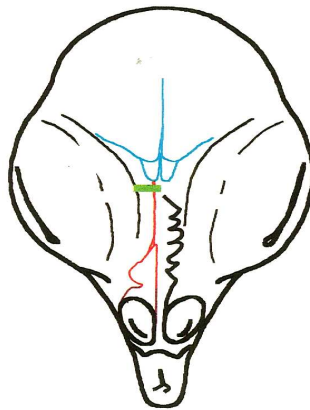


Schéma 1 : Section du nerf olfactif sur un embryon de poulet au stade E16.

Chez les poussins nouveaux-nés de 2 à 5 jours, l'axotomie est réalisée de la même façon. Toutefois, les poussins sont anesthésiés(ketamine, Imalgène 500, Rhône Mérieux) ce qui facilite l'opération bien que l'ossification du frontal et du nasal ait progressé. Les animaux opérés sont surveillés et incubés dans des boîtes placées en incubateur afin de faciliter leur cicatrisation. La survie des poussins opérés est

supérieure à 80%. Ils sont sacrifiés de la même manière que les embryons toutes les 12 heures au cours des 3 jours suivants.

II-1-2. Application d'IGF-1

Afin d'étudier l'action de l'IGF-1 (Insulin like Growth Factor 1) sur le tissu déafférenté, l'axotomie est effectuée chez des poussins de 2 jours anesthésiés et un tampon de fibres réabsorbables (Jonhson and Jonhson) imbibé de 100 µg d'IGF en solution (Gropep Australie) est immédiatement ajusté dans la solution de continuité nerveuse. Les poussins sont sacrifiés par décapitation 24, 48 et 72 heures après traitement (voir publication N°2 pour plus de détails).

II-1-3 Analyses Statistiques

Les expériences ont toutes été réalisées au moins 5 fois. Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm s (écart-type). Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant des tests non paramétriques (comparaison de population appariées par test de Wilcoxon, comparaison de populations non appariées par test de Mann-Whitney) au moyen du logiciel Stat-View 4.5. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives

II-2 Prélèvements d'épithéliums olfactifs et cultures primaires :

II-2-1 : cultures primaires aviaires

Les épithéliums sont prélevés stérilement sur des embryons de poulet de 14 jours (E14) et sur des cailles de 11 jours (E11). Les têtes de ces embryons sont prélevées puis disséquées à l'aide d'instruments de microchirurgie stériles. L'épithélium olfactif est

alors extrait et déposé dans une solution de milieu de culture stérile (Neurobasal médium, Gibco). Après avoir ôté manuellement la sous muqueuse, les épithéliums sont déposés dans une solution de milieu de culture contenant 10% de trypsine (Gibco) pendant 30mn. Puis la trypsine est inhibée avec du milieu de culture supplémenté en sérum de veau fœtal (SVF) 10% (Gibco). Les cellules sont alors dissociées manuellement et filtrées sur un filtre possédant des pores de 100 μ m de diamètre (Becton Dickinson) de manière à éliminer les fragments de tissus non dissociés. Les cellules sont alors remises en culture (labtech, FisherBioblock) dans du milieu Neurobasal médium supplémenté par 10% de SVF et incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé toutes les 48 heures.

II-2-2 cultures primaires humaines

Les fragments d'épithélium humains nous sont fournis de manière stérile, condition gardée tout au long de la manipulation. Après avoir dissocié l'épithélium d'éventuels fragments d'os, le cartilage est enlevé manuellement à l'aide d'instruments de microchirurgie stériles. Puis les fragments d'épithélium sont déposés dans une solution contenant du milieu de culture neurobasal medium (Gibco) et 10% de trypsine. Après avoir inhibé la trypsine avec du milieu de culture supplémenté en SVF 10%, les cellules sont dissociées et réensemencées selon un protocole identique à celui décrit précédemment pour les cellules olfactives aviaires.

II-3 : Tri cellulaire et cultures des cellules triées

Le protocole concernant le prélèvement est identique à celui utilisé pour les cultures primaires. Avant d'être remises en culture, les cellules sont triées par la **technique de FFF (Flux Flow Fractionation)**. Cette technique de tri est basée sur les différentes forces s'exerçant lors de l'écoulement d'un liquide. La solution contenant les cellules en suspension à trier est injectée dans un tube dont l'épaisseur et la largeur sont relativement faibles par rapport à la longueur, ainsi le flux de liquide possède un profil parabolique. Les cellules sont alors soumises à différentes forces les entraînant à s'élever au niveau de la phase liquide. Une force centrifuge est également appliquée de manière à ce que les cellules les plus grosses sortent de l'appareil en premier et les petites cellules en dernier. Il est à noter qu'à taille égale les cellules les plus denses sont retenues plus longtemps que les cellules moins denses. Les conditions permettant la purification des cellules basales horizontales ont été mises au point en collaboration avec le Dr Serge Battu de l'équipe du Pr Cardot. .

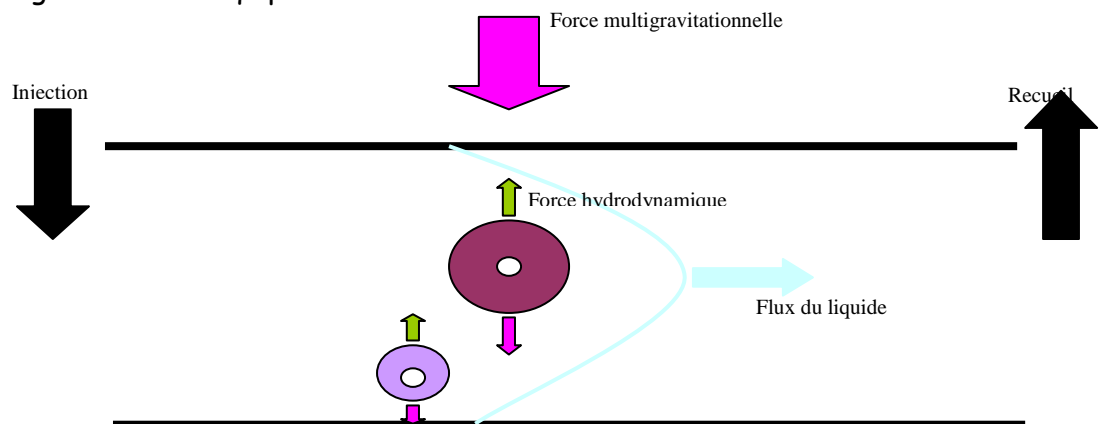


Schéma 1 : Principe de la FFF

Une fois le tri réalisé, les fractions récoltées sont mises en culture dans du milieu neurobasal medium (Gibco) supplémenté par 10% de B27. Il s'agit d'un supplément de culture spécifique pour les neurones et permettant l'observation des effets dépendants de l'ajout de facteurs de croissance.

II- 4 : Applications de facteurs de croissance *in vitro*.

De manière à tester l'effet de facteurs de croissance sur les cellules triées, 50 à 100 ng/ml de NGF (Gibco) et 10 à 20 ng/ml de FGF2 (Gibco) sont ajoutés aux cellules immédiatement après le tri lors de la mise en culture. Les effets de ces facteurs sont analysés 24h (effet sur la prolifération cellulaire) et 48h (effet sur la différenciation) par observation de la morphologie des cellules, par immunocytochimie en utilisant des marqueurs spécifiques de chaque type cellulaire et par comptage du nombre de cellules marquées.

II-5 Greffes des cellules triées par FFF.

Les greffes sont pratiquées avec des instruments de microchirurgie qui ont été préalablement stérilisés dans un four Poupinel (2h à 120°C).

Les manipulations sont effectuées *in ovo* sous la loupe binoculaire au grossissement X25 et X40, à l'aide de micro scalpels que nous taillons nous même en forme de faucille dans la pointe d'une aiguille à coudre sur des pierres à affûter (pierres de l'Arkansas). Cette technique a été mise au point par C. Ayer-Le Lièvre et MA. Teillet en 1970 à Nantes dans le laboratoire du Pr N. Le Douarin pour la greffe de crêtes neurales. Elle a été récemment décrite en détail par le Pr H. Nakamura en 2001.

Les œufs de poulet sont incubés à plat , après prélèvement de 2 ml d'albumine, une fenêtre est faite dans la coquille au dessus de l'embryon 3 jours (stades 18 à 20 de H&H) pour pratiquer la greffe. Les membranes vitelline et amniotique sont fendues au dessus de la tête de l'embryon grâce au micro scalpel, de cette manière le mésencéphale de l'embryon est accessible. 10 000 cellules de cailles au préalable triées par FFF sont ensuite injectées à l'aide d'une micro pipette étirée à la main sous la flamme. Le mésencéphale est perforé par la pointe de la micro pipette. La solution contenant les cellules est ensuite injectée le plus doucement possible en effectuant un mouvement de

retrait progressif de la pipette à l'intérieure du mésencéphale de manière à maintenir la solution au fond de la cavité.

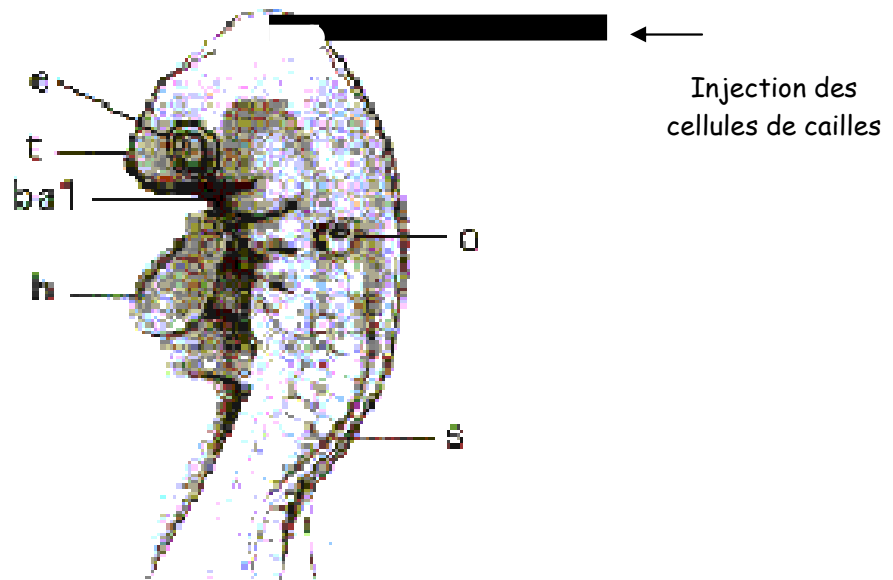


Schéma 3 : Injection des cellules de cailles préablement triées au niveau du mésencéphale d'un embryon de poulet de 3 jours. (ba1 : 1^oarc branchial; e:œil, o:ebauche optique; t: télencephale, s :somites)

III TECHNIQUES HISTOLOGIQUES

III-1 Préparations des échantillons

Les embryons sont sacrifiés à différents stades après manipulation ou pour le prélèvement de l'épithélium olfactif. Tous les tissus principalement des têtes d'embryon, sont congelés dans des vapeurs d'azote liquide ou dans le congélateur à -80°C, puis stockés à -80°C.

Les têtes congelées sont coupées sur un cryostat (CM 3050, Leica) à une température de coupe de -25°C. Les coupes de 12µm d'épaisseur sont déposées sur des lames superfrost/plus (Menzel-Glazer, Allemagne) pour l'hybridation *in situ* (HIS) ou sur des lames dégraissées pour l'immunohistologie courante. Quelques coupes sont colorées à l'hématoxyline de Groat pour vérifier la bonne conservation des tissus et également afin de repérer si la zone d'intérêt est bien atteinte sur l'embryon. Les coupes sont ensuite conservées à -80°C en attendant d'être traitées pour l'hybridation *in situ* ou encore pour l'immunohistologie.

La fixation des coupes diffère en fonction de la technique qui est appliquée (HIS ou Immunocytochimie). Les deux fixateurs que nous employons pour les deux techniques sont le paraformaldéhyde 4% (PFA 4%) et l'acétone. La durée de fixation peut varier en fonction de la technique et du type de matériel, ainsi la fixation au PFA 4% dure 8 min pour des coupes à congélation alors que le même fixateur va agir 30 min sur les cellules lors de la fixation précédent une Hybridation *in situ*.

III-2 Techniques d'Immunohistologie et Immunocytochimie

Nous avons développé 4 techniques d'immunohistologie sur des coupes à congélation et une technique d'immunocytochimie sur les cellules des cultures primaires et triées de cellules olfactives. Les 4 techniques d'immunohistologie sont basées sur l'utilisation des anticorps suivants: Anticorps QCPN, anti-kératine, anti-trkA, anti-CaMKinase II et enfin anti-BrdU. Chacun de ces anticorps présente un intérêt particulier. Il est à noter que l'ensemble de ces expériences ont été réalisées sur des coupes (Immunohistochimie révélée par la diaminobenzidine (DAB)) et sur des cellules (immunocytochimie révélée par DAB ou immunofluorescence indirecte).

Les anticorps QCPN permettent de distinguer les cellules de caille des cellules de poulet en marquant spécifiquement les premières. Cet anticorps a été utilisé afin de vérifier la présence de cellules de cailles injectées au niveau du mésencéphale du poulet. En effet, lorsque la greffe a pris, les cellules de cailles se sont développées et présentent donc un marquage avec l'anticorps QCPN contrairement aux cellules de poulet environnantes. Cet anticorps monoclonal nous a été aimablement fourni par l'Institut d'Embryologie Cellulaire et Moléculaire du Collège de France et est utilisé selon la technique détaillée par M. Hallonet.

La fixation des coupes est faite dans du PFA 4% pendant 10 min, elle est suivie de 3 lavages PBS 1X de 5 min chacun. Afin de bloquer les peroxydases endogènes qui pourraient provoquer un bruit de fond lors de la révélation, nous appliquons sur chaque coupe du PBS1X+H₂O₂ 0,3%, nous rinçons ensuite 3 fois au PBS 1X, 5 min avant de bloquer les sites non spécifiques pour l'anticorps avec une solution de PBS 1X + BSA 1% durant 30 min. La solution contenant l'anticorps primaire anti QCPN (liquide d'ascite) est ensuite ajoutée non dilué et va agir sur les coupes 1 nuit à 4°C ou 2h30 à température ambiante. On rince ensuite 3 fois encore dans PBS 1X avant de déposer l'anticorps secondaire (anti-souris conjugué à la peroxydase, Sigma, France) dilué au

1/200° dans PBS 1X + BSA 1%. Après 3 nouveaux lavages au PBS 1X, nous révélons le marquage avec de la DAB (Boehringer Mannheim).

Les anticorps anti-Calmoduline Kinase II dépendante du calcium (CaMKII) reconnaissent une protéine relativement ubiquitaire du système nerveux des vertébrés, présente chez les mammifères et les oiseaux. La CaMKII est une enzyme constitutionnelle composée de plusieurs sous unités, dont les deux plus abondantes sont les sous-unités α et β . Cette enzyme est exprimée par les neurones matures. Généralement, la détection des neurones olfactifs matures chez les mammifères s'effectue plutôt grâce à des anticorps dirigés contre l'OMP (Olfactory Marker Protein) (Margolis, 1988; Calof et al., 1996; Murray et Calof, 1999). Cependant, comme les neurones olfactifs des oiseaux n'expriment pas cette protéine (Margolis, communication personnelle; Ayer et al., 1995), nous avons donc utilisé un anticorps monoclonal de souris anti-CaMKII testé chez le poulet par M. Leibovici au stade embryonnaire E18 (Leibovici et al., 1996) et par M. Mathonnet (Mathonnet et al., 2001) chez des poussins de 1 à 5 jours postnataux (PN1 à 5j).

Nous avons utilisé cet anticorps sur des coupes d'embryon de poulet et sur des cultures primaires et triées de cellules olfactives. Selon les expériences effectuées, le protocole est légèrement modifié.

Les coupes sont préparés et fixées d'une façon classique avec du PFA 4% pendant 10min. Les cellules sont fixées 20min avec de l'acétone à -20°C . Après 3 lavages au PBS1X de 5 min, on pratique une perméabilisation des tissus avec une solution de PBS 1X + 0,3% Triton X-100 pendant 5 min maximum à 4°C , une action trop longue du triton pourrait en effet diminuer le marquage CaMKII. Les coupes sont ensuite rincées 3 fois avec du PBS1X. Si la révélation est réalisée avec la DAB, les peroxydases endogènes sont inhibées par une solution de PBS 1X+H₂O₂ 0,3% pendant 30 min à l'abri de la lumière. Après avoir saturé les sites non spécifiques avec une solution de PBS 1X + BSA 1% pendant 30 min à température ambiante. L'anticorps anti CaMKII dilué au 1/100°

dans la solution de blocage est ensuite déposé sur les coupes ou sur les cellules qui seront incubées pendant 1 nuit à 4°C. Puis, les lames sont rincées dans du PBS 1X 3 fois 5min et l'anticorps secondaire (Anti souris conjugué peroxydase, Sigma ou alexa fluor 488, Molecular Probes) dilué au 1/200° est appliqué pendant 90 min. **Le marquage est révélé par la DAB lors de l'utilisation d'anticorps secondaires conjugués peroxydase (Boehringer Mannheim, France).**

Concernant les anticorps **anti-trkA** et **anti-kératine**, les protocoles utilisés sont identiques et sont décrits dans les publications 4, 5 et 6.

III-3 Techniques de détection de prolifération cellulaire (BrdU):

Le BrdU (5-bromo-2'-désoxyuridine) est un homologue de la thymidine. Il peut ainsi être incorporé dans l'ADN au cours de la phase de réplication (phase S) du cycle cellulaire. L'utilisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre le BrdU permet de détecter les cellules en mitose (Gratzner et al., 1975).

Nous avons donc utilisé ce principe pour détecter la régénération neurosensorielle au sein du tissu olfactif après axotomie isolée (Mathonnet et al., Neurosciences, 2001) ou associée à une application d'IGF-1 (Mathonnet et al., Neurosciences Letters, 2001). La technique opératoire a été décrite dans chacune de ces publications. Cette technique a également été utilisée pour l'étude de la prolifération des cellules triées et donc pour tester leur capacité d'autorenouvellement. Le protocole employé est décrit dans la publication 5.

III-4 Techniques de détection de l'apoptose.

III-4-1 : Fragmentation de L'ADN génomique *in vitro*.

Les nucléosomes libérés par l'action des endonucléases au cours de l'apoptose peuvent également être mis en évidence sur gel d'agarose. Ils migrent sous forme d'échelles caractéristiques.

L'ADN génomique est extrait d'épithéliums olfactifs d'embryons et de poussins opérés et fraîchement disséqués. Les épithéliums témoins et les épithéliums axotomisés sont traités séparément et en parallèle. En raison de la taille des échantillons, pour chaque période étudiée, il a été nécessaire de réunir au moins 4 épithéliums pour au minimum 3,5µg d'ADN.

▪ Extraction et purification de l'ADN génomique

L'extraction et la purification de l'ADN génomique ont été effectuées selon un protocole phénol/chloroforme. Dès leur prélèvement, les tissus sont rapidement homogénéisés, puis mis à incuber 6 heures à 37°C dans un tampon de lyse (300 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH8, 25 mM EDTA pH8, 0,15 mg/ml protéinase K, 100µg/ml RNase). Au terme de cette incubation, un mélange à part égale de phénol/chloroforme est déposé sur le lysat. Après 5 min de centrifugation à 10000tr/min, la phase supérieure, aqueuse contenant l'ADN génomique est récupérée et le culot, jeté. L'ADN génomique est précipité par adjonction de 1/10^e de volume d'acétate de sodium et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -20°C. Conservé au minimum à -20°C, les échantillons sont ensuite centrifugés 20 min à 10000 trs/min. Le culot d'ADN ainsi obtenu est soigneusement lavé par addition de 500µl d'éthanol 70%, puis séché à l'air ambiant et resuspendu dans 20 µl d'eau distillée. Avant marquage des fragments 3'OH, un dosage de la quantité d'ADN génomique présente dans les échantillons est réalisé par spectrophotométrie UV (le rapport des densités optiques (DO) à 260 et 280 nm doit être d'environ 1,8). La

concentration de l'ADN est normalement d'environ 300ng/ μ l. Les préparations peuvent être conservées à -20°C.

- Marquage des fragments 3'OH

Nous avons appliqué le protocole de marquage selon le kit DIG Oligonucléotide 3' End-Labeling (Roche Molecular, Germany).

Les réactions sont réalisées par addition de 1 μ g d'ADN dans un mélange contenant 5mM de chlorure de Cobalt (CoCl₂), 0,05 mM de ddUTP marqués à la digoxigénine (DIG-11-ddUTP), 2,5 U/ μ l de terminal transférase et 4 μ l de tampon dans un volume final de 20 μ l. Après 15 min d'incubation à 37°C, la réaction est stoppée par abaissement brutal de la température (+4°C) et l'ADN marqué est précipité selon le protocole précédemment décrit. Après remise en suspension dans un tampon TE (10mM tris-HCl pH8, 1mM EDTA), les ADNs sont déposés sur un gel d'agarose à 2%, préparé extemporanément, ce qui permet de séparer des fragments de tailles différentes. Au terme de la migration un transfert par capillarité de ces fragments d'ADN est effectué sur une membrane de nylon (Genscreen, Dupont Boston, MA). Les ADNs sont fixés sur celle-ci par ultra-violets. La membrane est ensuite incubée avec un anticorps anti-digoxigénine conjugué à la phosphatase alcaline. Cet anticorps est détecté par application d'un marqueur luminescent le CDP-Star (Roche molecular, Germany) révélé sur film radio (Kodak X-Omat AR Film, Eastman Kodak, Rochester, NY).

III-4-2 : TUNEL

La technique TUNEL est basée sur la détection *in situ*, c'est à dire sur coupes histologiques ou des cellules, de l'ADN clivé par les endonucléases en nucléosomes dont la longueur est multiple de 180 paires de bases (pb). les nucléosomes générés par une action enzymatique ont une extrémité 3'-OH. La technique TUNEL permet un marquage *in situ* en 3' des extrémités libres générées. Ce marquage est réalisé sur coupes de

tissus ou cellules fixées. La TdT (terminal désoxyribonucléotidyl-transférase) catalyse la polymérisation nucléotidique au niveau de l'extrémité 3'OH libre. Cet enzyme permet d'ajouter aux extrémités 3' des fragments d'ADN, des résidus dUTP conjugués à un marqueur biologique. Selon le marqueur utilisé les cellules en apoptose peuvent être détectées par fluorescence ou immunohistochimie. Les détails techniques ont été précisés dans la publication N°1.

IV TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRES.

IV-1 : Hybridation in situ : analyse spatio-temporelle de l'expression de gènes

La technique d'hybridation *in situ*, permet de suivre l'expression de différents gènes au cours du développement des embryons aviaires. Cette technique utilise des sondes ribonucléotidiques. Ces sondes sont préparées à partir de plasmides pGEM-T Easy (Promega) dans lesquels des fragments de gènes d'intérêt ont été insérés. En effet ce plasmide contient les promoteurs et les sites d'initiation de la transcription des ARNs polymérases virales SP6 et T7. De plus de manière à vérifier que l'insertion du clone dans le vecteur est correcte, le plasmide contient, au niveau du site multiple de clonage, le gène de la β -galactosidase. Ce gène, lorsqu'il est exprimé, catabolise deux substrats le 5-bromo4-chloro3indolyl β -D-galactoside (X-gal) et l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) aboutissant ainsi à une coloration des colonies bactériennes en bleu. Lorsque l'insert est cloné dans le vecteur, le gène de la β -galactosidase est interrompu, la protéine est tronquée et les colonies bactériennes restent blanches.

La préparation des ribosondes marquées à la Digoxygénine (DIG) s'effectue en plusieurs étapes.

IV-1-1 Préparation, vérification et marquage des sondes

IV.1.1.1 Amplification du vecteur, préparation et purification de l'insert

▪ Ligature et transformation bactérienne par choc thermique

L'insert peut être directement ligaturé dans le vecteur PGEMT-EASY (Promega). A 25 ng de produit de PCR sont ajoutés 1 μ l de tampon de ligature (10X), 50 ng de vecteur et 3 unités de ligase T4. Le volume total est ramené à 10 μ l et le mélange est incubé toute la nuit à 16°C.

Le plasmide à amplifier est alors introduit dans une souche de bactéries JM109 sensibles aux antibiotiques (bactéries compétentes d'E. Coli: Proméga). Les bactéries sont rendues perméables aux acides nucléiques étrangers par choc thermique selon un protocole classique :

A 100 μ l de suspension de bactéries compétentes, on ajoute 1 à 50 ng d'ADN plasmidique portant l'insert. Après homogénéisation, le tube est placé dans la glace pendant 20 minutes puis transféré rapidement dans un bain marie à 42°C. Au bout de 1 min le tube est replacé dans la glace et laissé 2 min à 0°C. On ajoute ensuite 900 μ l de milieu SOC (LB + 1 ml Mg^{2+} +1 ml glucose 2M) à température ambiante et on incube pendant 60 min à 37°C sous agitation (environ 225 rpm). après ce délai, la transformation est normalement terminée et 100 μ l de suspension sont étalés sur des boites de pétri contenant du LB gélosé (Luria Broth Base: Merck) et de l'ampicilline (marqueur de sélection des bactéries transformées, Sigma) diluée au 1/1000éme. Les boîtes sont placées dans l'étuve à 37°C pendant la nuit.

▪ Préparation d'ADN double brin plasmidique

Selon la quantité d'ADN souhaité, deux types de préparations ont été effectuées.

Mini préparation

Les bactéries sont récupérées par centrifugation à 15000 rpm. Le plasmide est alors purifié à partir du culot obtenu grâce au kit WiZard plus SV minipreps (Proméga).

Maxi préparation

Dans ce cas, on ensemence les bactéries, contenant le plasmide d'intérêt dont on a préalablement vérifié l'insertion correcte du fragment cloné, dans 500 ml de LB contenant de l'ampicilline diluée au 1/1000ème. La culture dure environ 24h à 37°C puis la suspension bactérienne est centrifugée (5 min, 10000g, 4°C) et l'ADN plasmidique est purifié en utilisant le Kit Wizard Plus Maxipreps DNA purification System (Proméga). Etant donné les très gros volumes à centrifuger, il est indispensable d'utiliser une centrifugeuse adaptée. Les quantités d'ADN récupérées après purification peuvent être évaluées sur gel ou quantifiées à l'aide d'un spectrophotomètre. La maxipréparation permet en général de récupérer environ 700 µl de vecteurs à 1,5 µg/ µl.

▪ Séquencage

600 ng de plasmide sont ajoutés à 2,5 µl d'amorces SP6 ou T7 (10 ng/µl) dans un volume final de 12 µl. Le mélange est mis à incuber 3 min à 95°C de manière à dénaturer le double brin d'ADN puis il est aussitôt refroidi dans la glace pendant 3 min. Une réaction de polymérisation en chaîne est réalisée selon le programme suivant (5' à 95°C)_{X1} puis (30" à 95°C + 10" à 51°C + 4' à 60°C)_{X30} à partir de ce mélange et en présence de 8 µl de mélange réactionnel contenant des désoxynucléotides marqués par des fluorochromes (Perkin Elmer). La précipitation des produits de PCR est réalisée à l'aide de 2 µl d'acétate de sodium (pH 4,8) additionné de 50 µl d'éthanol absolu froid. Après une incubation de 10mn sur la glace et une centrifugation de 20mn à 15000 rpm, le culot obtenu est lavé à l'aide de 500 µl d'éthanol à 70% et séché 10mn à température ambiante. Puis il est repris dans 25 µl de tampon d'échantillon. L'ensemble est ensuite incubé 3 mn à 95°C puis aussitôt refroidi dans la glace pendant 3 mn. Le produit de la

réaction de séquence est analysé en électrophorèse capillaire sur un séquenceur automatique (Perkin Elmer).

IV-1-1-2 Marquage de la sonde

Les sondes utilisées lors de l'hybridation *in situ* sont synthétisées par transcription *in vitro*. Le marquage de l'ARN est réalisé par incorporation, lors de la transcription, d'UTPs marqués à la digoxygénine. Durant ces étapes, il est nécessaire de travailler dans un environnement exempt de RNase, et à des températures ne dépassant pas 4°C pour éviter une dégradation rapide des ARNs.

- **Principe du marquage à la digoxygénine.**

Le système DIG (Roche molecular) de marquage non radioactif utilise la digoxygénine, un haptène stéroïde pour marquer l'ARN. Pour produire des ARNs marqués à la DIG, l'ADNc cloné est transcrit *in vitro* par les ARNs polymérases SP6 ou T7, en présence d'UTP marqués à la DIG. Ils sont détectés grâce à un anticorps anti-digoxygénine dont le fragment Fab est couplé à la phosphatase alcaline. L'activité enzymatique est ensuite visualisée par des substrats colorés comme le NBT-BCIP (nitrobleu-tetrazolium, 5-bromo 4-chloro 3-indolylphosphate) (Roche molecular) qui produit une coloration bleue.

- **Linéarisation du plasmide.**

La linéarisation du plasmide est nécessaire pour une bonne synthèse de la sonde. Elle évite, en effet, la transcription complète du plasmide. L'enzyme de restriction est choisie dans le site multiple de clonage en fonction de la sonde souhaitée. Ainsi, l'une des sondes correspond à l'antisens de l'ARN messager synthétisé *in vivo*, alors que l'autre est la copie conforme de l'ARN messager et ne pourra donc pas s'hybrider avec ce

dernier. Ce type de sonde sert généralement de contrôle négatif. A 600 ng d'ADN sont ajoutés 5 μ l de tampon de digestion, 5 μ l de BSA (1mg/ml) et 1 U d'enzymes. Le mélange, pour un volume final de 50 μ l est complété par de l'eau traitée « milliQ ». Après une incubation pendant 1h30 à 37°C, les produits de digestion sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% ce qui permet de vérifier la bonne linéarisation des plasmides.

▪ **Transcription *in vitro***

Le mélange suivant est réalisé et incubé 2h à 37°C.

<u>Réactifs</u>	<u>Volume</u>	<u>Concentration finale</u>
ADN purifié	1 μ g	0,05 μ g/ μ l
Mélange de NTPs	2 μ l	1X
Tampon de transcription	2 μ l	1X
ARN polymérase	2 μ l	2u/ μ l
Inhibiteur de RNase	1 μ l	
H ₂ O milliQ	18 μ l	

Au produit de transcription sont ajoutés 0,1 volume de LiCl 4M et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Le mélange est laissé à précipiter 2 h à -80°C. La solution de ribosondes est ensuite centrifugée à 15 000 rpm pendant 20 mn à une température de 4°C. Le culot ainsi obtenu est lavé à l'éthanol à 70% puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions. Après séchage, le culot est repris dans 20 μ l d'H₂O milliQ.

IV-1-1-3 Vérification qualitative et quantitative des sondes :

Elle permet de vérifier la qualité de marquage de la sonde, mais également de quantifier ce marquage. Sur une membrane chargée positivement (*Hybond*), on dépose 1 μ l de préparation de ribosondes pures ainsi qu'1 μ l de sonde diluée au 10^{ème}, au 100^{ème}, et au 1000^{ème}. La même opération est effectuée pour un témoin positif dont on connaît la concentration et pour un témoin négatif (ARN non marqué). Puis la membrane est séchée

à l'air et l'ARN fixé par exposition aux UV. Le marquage est révélé par le NBT-BCIP selon un protocole identique à celui utilisé pour l'hybridation *in situ*.

Pour vérifier l'intégrité des sondes néo-synthétisées et leur taille, les sondes (2 μ l) sont soumis à une électrophorèse sur gel de TAE 0.5X contenant 1.2% d'agarose. Après ces vérifications, elles sont aliquotées par 5 μ l et conservées à - 80°C pendant 4 mois maximum.

IV-1-2 Hybridation *in situ*

IV-1-2-1 Fixations

Avant utilisation, les coupes sont fixées 8 minutes dans du para-formaldéhyde (PAF) 4%. L'excédent de PAF est éliminé par 3 lavages de 5 mn dans du PBS 1X.

IV-1-2-2 Préhybridation

La préhybridation prépare les lames à l'hybridation en bloquant les sites non spécifiques où pourraient venir se fixer la ribosonde et permet de bloquer les RNAses endogènes. Les lames sont incubées 10 mn dans le tampon d'acétylation. Trois lavages de 5mn au PBS 1X permettent ensuite d'éliminer l'excès de tampon d'acétylation. 200 μ l de milieu de préhybridation (*formamide 50%, SSC 5X, Denhart 5X, tRNA (1.25 ng) solution de blocage (1 %)*) contenant de l'ADN de sperme de saumon (10 μ g/ml) dilué au 1/20^{ème} sont déposés par lames. Celles-ci sont ensuite incubées de 4 à 6 h à température ambiante.

IV-1-2-3 Hybridation

Les ribosondes sont préalablement dénaturées à 85°C pendant 5 minutes et rapidement transférées dans la glace. Cette étape permet d'éliminer toutes les

structures secondaires de l'ARN. Le tampon de préhybridation est chauffé à 72°C et 200 ng de sondes par ml de tampon sont rajoutés. 50 µl de ce mélange sont déposés sur chaque lame recouverte ensuite d'une lamelle. Les lames sont incubées toute la nuit à 72°C qui est la température d'hybridation spécifique des sondes que nous avons utilisées. Cette température a été calculée selon la formule suivante : $T_m = 79,8^\circ\text{C} + 18,5 \log[\text{Na}^+] + 0,58(\%GC) + 11,8(\%GC)^2 - 0,35(\%\text{formamide}) - 820/N$ (N=longueur de la sonde en pb)

- **Rinçages stringents**

Durant cette étape, permettant d'éliminer la sonde en excès, les lames sont plongées dans du SSC 5X préchauffé à 72°C pendant quelques minutes jusqu'à ce que les lamelles se détachent. Un bain d'une heure dans une solution de SSC 0.2X à 72°C garantit la spécificité de liaison de la ribosonde .

- **Révélation**

Les lames sont plongées dans le tampon de lavage ou B1 (*acide maléique 0.1M, NaCl 0.15M*) pendant 5 mn à température ambiante puis recouvertes, pendant 1h d'une solution de blocage préparée extemporanément (200 µl / lames). Cette étape permet de bloquer les sites non spécifiques pouvant être reconnus par l'anticorps. Un mélange de solution de blocage (1 %) et d'anticorps anti-DIG dilués au 1/5000 ème est laissé pendant 60 minutes sur chacune des lames (200µl/lame). Deux lavages dans B1 pendant 30 mn permettent d'éliminer les anticorps qui ne se sont pas fixés. Les lames sont équilibrées dans le tampon de révélation ou B3 (*TrisHCl 100mM, NaCl 100mM, MgCl₂ (pH 9.5)*) pendant 5 mn. La solution de révélation est préparée à partir de 10ml de B3 auxquels sont ajoutés 200µl de NBT-BCIP. 200µl de ce mélange sont déposés sur chaque lame. Après une incubation d'une nuit à 30°C, la réaction est arrêtée par rinçage des lames à l'eau distillée. Les coupes marquées peuvent être conservées dans du PBS ou bien montées dans un milieu aqueux (*Immu-mount, Shandon*) et stockées à 4°C.

L'observation est effectuée sur microscope Leica DMRX en fond clair ou en contraste interférentiel (Nomarski). Les prises de vues effectuées par une caméra sont stockées par informatique. Le logiciel LIDA est utilisé pour la gestion des fichiers d'images.

IV-2 : "Differential Display" ou DDRT:

De manière à isoler les gènes impliqués dans la neurogenèse et/ou la mort neuronale, nous avons utilisé la technique de « differential display » ou DDRT. Cette technique est basée sur l'expression différentielle de gènes dans deux conditions expérimentales ou physiologiques différentes. Dans notre cas, l'ensemble des gènes exprimés en l'absence de lésion est comparé à l'ensemble des gènes exprimés 24 heures après la lésion.

A partir des ARNs totaux extraits dans ces deux conditions , des fragments d'ADN complémentaires ont été synthétisés. Cette synthèse a été réalisée en utilisant des amorces oligoD(T)s et décamériques aléatoires. Les fragments de gènes ainsi obtenus ont été visualisés sur gel de polyacrylamide. Les amplifiats spécifiques de l'une des deux conditions ont été retenus et amplifiés à nouveaux par PCR, en utilisant les amorces ayant permis de les générer. L'étude et la caractérisation de trois de ces fragments m'ont été confiés.

IV-2-1 Comparaison avec les banques de données.

Après séquençage des fragments isolés, les séquences obtenues sont comparées à l'ensemble des séquences répertoriées dans les banque de données, pour cela un blast est réalisé (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

IV-2-2 Northern blot et Southern blot

L'expression des gènes correspondants aux fragments clonés par DDRT est vérifié par Northern blot. En effet, la technique du « differential display » présente le

désavantage de produire de nombreux « faux positifs » Cette technique permet de détecter l'expression d'un gène dans un tissu particulier mais également de déterminer la taille de l'ARN messager correspondant. De plus, cette technique permet de mettre en évidence les différents épissages pouvant se produire au niveaux des ARNs primaires correspondant à un gène particulier et présent au niveau d'un tissu particulier. Le Southern blot est une technique permettant d'analyser les clones phagiques isolés lors du criblage de la banque d'ADN génomique.

IV-2-2-1 : Extraction des ARNs

Après l'étude de l'expression des gènes d'intérêt par hybridation *in situ*, différents tissus au niveau desquels ces gènes semblent être exprimés ont été prélevés à l'aide d'instruments de microchirurgies stériles. Les ARNs totaux sont extraits à partir de ces différents tissus c'est à dire l'épithélium olfactif, la rétine et l'hyperstriatum de poulet au stade embryonnaire de 16 jours. Cette extraction est réalisée en utilisant le Kit RNAgents Total RNA Isolation System (Proméga). Tous les échantillons sont maintenus à 4°C dans un environnement exempt de RNAses. Un dosage de la quantité des ARNs totaux présente dans chaque échantillon est réalisé par spectrophotométrie UV à 260 nm (le rapport des DO à 260 et 280 nm doit être supérieur à 2). Les préparations peuvent être conservées plusieurs mois à -80°C.

IV-2-2-2 : Préparation de la sonde radioactive :

La sonde radioactive correspondant aux gènes d'intérêt est synthétisée à partir des fragment, isolés par DDRT, inséré dans le vecteur PGEM-T EASY. Le principe de cette technique consiste à synthétiser à l'aide d'amorces aléatoires, des fragments d'ADN au niveau desquels des dCTP marqués au P³² ont été incorporés.

- **Libération de l'insert**

De manière à s'assurer de la bonne spécificité des sondes synthétisées, l'insert est au préalable libéré du plasmide par digestion enzymatique. Sachant qu'à chacune des extrémité du site multiple de clonage se trouvent les sites de restriction de l'enzyme EcoRI, cette enzyme est le plus souvent choisie pour extraire l'insert du plasmide. Il est toutefois important de s'assurer qu'aucun site de restriction correspondant à cette enzyme n'est présent dans la séquence nucléique de l'insert.

Après migration du produits de digestion, la bande correspondante à l'insert est extraite du gel grâce au kit Qiaquick (Qiagen).

- **Synthèse de la sonde radioactive :**

200ng d'inserts dans un volume final de 30 μ l sont dénaturés pendant 3min à 95°C puis incubés 3min dans la glace. Puis 5 μ l d'une solution contenant les hexamères et de la BSA ainsi que 20 μ l d'une solution de dATP, dTTP, dGTP sont ajoutés au fragment d'ADN dénaturé. Après l'addition de 2 μ l de dCTP³² (environ 20 μ Ci) et de 1,5 μ l de polymérase (fragment Klenow de l'ADN polymérase I), le mélange est mis à incuber 1H30 à 37°C. Les protéines nécessaire à la polymérisation sont, ensuite, extraites de l'échantillon par un volume égal de phénol. Après une centrifugation de 5 min à 12000rpm, la phase contenant le phénol et les proteines est enlevée. L'ADN marqué est alors précipité par 20 μ l d'acétate de sodium 3M pH7 et 500 μ l d'éthanol absolu froid. Ce mélange est incubé au minimum 30 min à -80°C. Après une centrifugation de 15min à 15000rpm et à 4°C, le culot contenant les sondes marquées est mis à sécher 10 min à température ambiante. Puis l'ADN est resuspendu dans 100 μ l de TE et 50 μ l d'ADN de sperme de saumon. Ce mélange est ensuite dénaturé 3 min à 95°C puis incubé 3 min dans la glace. L'échantillon contenant la sonde peut alors être conservé quelques jours à 4°C.

▪ **Migration des ARNs et des ADNs**

Les électrophorèses pour la migration des ARNs totaux sont réalisées sur des gels composés de 1% d'agarose en tampon MOPS. Après dissolution de l'agarose dans le MOPS par ébullition, on laisse la température du gel baisser à 50°C puis 5,4 ml de formaldéhyde (37%) et 5µg de BET sont ajoutés pour 100 ml de gel. Puis l'ensemble est incubé à température ambiante, le temps que le gel soit polymérisé. 10 µg d'ARNs sont précipités par 0,1 volume d'acétate de Sodium 3M et 2,5 volume d'éthanol froid absolu pendant 30 min à -80°C. Puis l'échantillon est centrifugé 20 min à 15000rpm. Le culot, après avoir été lavé par 200µl d'éthanol à 70%, est repris dans 20µl de tampon de charge (formamide 0,72ml + MOPS 1X + 6% de formaldéhyde + 5% de glycérol + 0,26% de bleu de bromophénol). L'ensemble de cet échantillon est déposé sur gel, puis est soumis à une électrophorèse à 200Volts pendant 4H en tampon MOPS 1X. Une fois terminée, la migration correcte des ARNs est visualisée sous UV. En général, seuls les ARN ribosomiaux sont visibles sur le gel sous la forme de deux bandes.

La migration des ADNs s'effectue sur un gel contenant 0,7% d'agarose dissous dans du TAE 1X. Elle est réalisée le plus lentement possible pendant 6 heures au minimum à 50 Volts.

▪ **Transfert de gels sur membrane de nylon**

Cette technique permet de transférer les acides nucléiques du gel d'agarose sur une membrane de nylon dans le but de réaliser une hybridation de ces molécules avec une sonde d'ADN. Le transfert est généralement réalisé de façon passive. Les membranes utilisées sont le plus souvent des membranes de Nylon chargées positivement afin de fixer les acides nucléiques.

L'ARN étant monobrin, la dénaturation n'est pas nécessaire contrairement à l'ADN qui est dénaturé 3min à 95°C puis incubé 3min dans la glace. En revanche, afin de débarrasser le gel du formol qui pourrait gêner l'hybridation ultérieure, le gel d'ARNs subit deux bains de tampon SSC10X, neutre. Ce tampon est également utilisé lors du transfert sur membrane.

Pour le gel d'ADN deux lavages de 20 min dans du tampon dénaturant (NaCl 1,5M, NaOH0,5N) sont nécessaires à la séparation des brins d'ADN.

Le gel à transférer est déposé sur un pont de papier Whatman préalablement imbibé de tampon de transfert et dont les extrémités baignent dans ce même tampon. Sur ce gel, on dépose la membrane découpée aux dimensions exactes du gel et également imbibée de tampon. Il est important de ne laisser aucune bulle d'air dans ce montage. Sur la membrane, on dépose deux morceaux de papier Whatman imbibés de tampon puis 5 morceaux secs. Des piles de papier absorbant sont déposées sur le haut de ce montage puis un poids est appliqué facilitant le transfert des acides nucléiques sur la membrane. Après environ une nuit de transfert passif, le montage est démonté et l'emplacement des puits sur la membrane est noté. La membrane est alors séchée et les acides nucléiques sont fixés sur celle-ci par exposition aux UV.

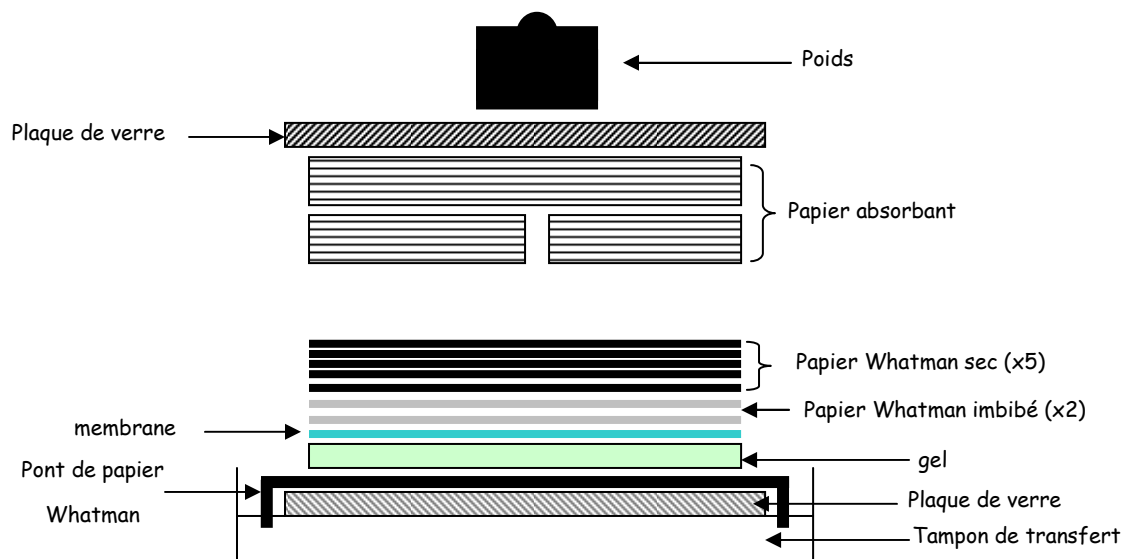


Schéma 2 : Principe du montage pour le transfert d'un gel d'ARNs sur membrane

▪ **Hybridation**

L'hybridation à l'aide d'une sonde radioactive d'ADN de séquence spécifique d'un acide nucléique donné permet la mise en évidence, dans notre cas, de l'ARN correspondant. La sonde marquée, dénaturée, permet un appariement avec l'ARN ou l'ADN. Un tel appariement permet de révéler ou d'infirmer la présence de l'acide nucléique recherché.

La membrane à hybrider est tout d'abord réhydratée dans de l'eau distillée puis placée dans un sac plastique. La membrane, avant l'hybridation proprement dite, subit une préhybridation de manière à la saturer. On verse dans le sac 10 à 30 ml de tampon d'hybridation (pour 800ml : 80g de sulfate de dextran, 300ml d'H₂O₂, 320ml de formamide désionisé, 160ml de tampon SCC20X, 2,8ml de Tris 2M pH 7,4, 8ml de Denhardt's 100X) additionné de 200 à 600 μ l d'ADN de sperme de saumon (2mg/ml) préalablement dénaturé. Ce dernier permet une saturation des sites non spécifiques de la membrane, diminuant ainsi le bruit de fond radioactif après hybridation. L'ensemble est incubé à température ambiante pendant au moins 1 heure.

La sonde radioactive dénaturée est ensuite mélangée à 5 ml de tampon d'hybridation puis ajoutée dans le sac. Après avoir scellé le sac en prenant soin de chasser toutes les bulles qui interfèreraient avec l'hybridation de la sonde, il est placé dans un bain marie à 42°C. L'hybridation s'effectue durant une douzaine d'heures sous agitation.

- **Lavages**

Les lavages permettent d'éliminer l'excès de sonde radioactive ainsi que les brins marqués accrochés non spécifiquement sur la membrane. Après l'hybridation, la membrane est ôtée du sac et subit 3 lavages de 10 min à température ambiante sous agitation dans la solution de lavage froid (SDS 0,1% et SSC2X). On procède ensuite à deux lavages chauds (SDS 0,5% et SSC 0,1X), à une température supérieure de 10°C à celle de l'hybridation. Les membranes sont alors légèrement essorées sur du papier absorbant puis enveloppées dans du film plastique afin d'éviter leur dessèchement total.

- **Révélation**

La membrane enveloppée dans du film plastique est placée au contact d'un film radiographique à l'intérieur d'une cassette. Celle-ci est placée à -80°C pendant plusieurs heures ; cette température permet une intensification du signal grâce à un écran

contenant un réactif fluorescent. Une fois le film développé, les acides nucléiques ayant fixé la sonde sont identifiés par des spots d'impression du film.

IV-2-3 : Criblage d'une banque d'ADN génomique :

Dans le but d'isoler la séquence nucléique entière du gène correspondant aux fragments clonés par DDRT, nous avons choisi de cribler une banque d'ADN génomique de poulet. Cette banque est réalisée par insertion de fragments d'ADN de poulet générés par une digestion partielle avec Sau 3A 1, dans un vecteur phagique lambda (Stratagene). Il est à noter que nous avons vérifié au préalable que les fragments isolés par DDRT appartenaient à un même exon. Ainsi ces fragments pourront nous servir de sondes pour le criblage de la banque.

IV-2-3-1 : Amplification de la banque

Le pouvoir infectieux du phage permet une multiplication des phages et donc une amplification de l'insert. L'amplification est nécessaire pour avoir de manière stable une grande quantité de phages et que la banque soit représentative.

A 600 μ l de bactéries compétentes (SRB) diluées dans une solution de MgSO₄ 10mM, on ajoute un volume de phages déterminé de manière à obtenir 1.10⁶ plages de lyse sur la totalité de l'étalement. Après 15 mn d'incubation, le mélange est ajouté à 6,5 ml de top agar liquide. Une fois le tapis bactérien parsemé de plages de lyse, il est recouvert de 8 à 10 ml de tampon SM et incubé à 4°C, ceci permettant aux phages de diffuser dans le SM. La solution contenant la banque amplifiée est récupérée et du chloroforme est ajouté à une concentration finale de 5 %. Après centrifugation 10 minutes à 500g, le surnageant est récupéré et l'on ajoute 0.3% de chloroforme. La banque est aliquotée dans 7 % de DMSO et conservée à -80°C. Elle est ensuite titrée selon le protocole précédent.

IV-2-3-2 Criblage de la banque

Cette étape est basée sur l'hybridation de l'ADN des phages par la sonde ADN spécifique du fragment choisi. Elle permet d'isoler un clone phagique comportant dans son génome, un fragment de l'ADN choisi. Une réplique est réalisée sur membrane de nylon (*Macherey-Nagel*). La position de la membrane chargée sur la boîte est soigneusement repérée lors du transfert afin de permettre une correspondance parfaite entre les phages transférés et ceux restant sur la boîte. Cette étape devra être renouvelée jusqu'à l'obtention d'un clone phagique pur.

A 600 μ l de bactéries compétentes, on ajoute l'équivalent de 50 000 plages de lyses. Les étapes d'infections et de cultures sont identiques à celles utilisées pour la titration. Une fois les plages de lyses apparues, les boîtes sont refroidies 2h à 4°C afin de limiter l'adhérence du top-agar sur la membrane. Les filtres sont appliqués stérilement et laissés en contact de la gélose pendant 15 mn. Puis sur la face inverse de l'empreinte, ils sont placés pendant 5 mn sur un papier Whattman 3MM imbibé de solution de dénaturation (0.5N NaOH et 1.5 M NaCl). Après fixation de l'ADN phagique par une exposition aux ultraviolets pendant 2 mn, ils sont neutralisés par contact sur un papier Whattman imbibé de solution de neutralisation (0,5M Tris HCl pH8 et 1,5M NaCl). Enfin, les membranes sont équilibrées en SSC 2X + 0,2M Tris-HCl pH 7.5 avant d'être séchées.

La préhybridation est réalisée en sachets scellés dans 5 ml de tampon d'hybridation identique à celui utilisé pour le Northern blot contenant 500 μ g/ml d'ADN de sperme de saumon. Après 1 à 2 h de préhybridation à 42°C, la sonde d'ADN marquée au dCTP³² est ajoutée dans le tampon d'hybridation. L'incubation est poursuivie à la même température pendant 12 h sous agitation. Puis les membranes sont lavées 2 fois 5 mn en SSC 2x, SDS 0.1% puis 2 fois 15 mn en SSC 0,5X SDS 0,1% à 60°C. Après ces différents lavages, les membranes sont séchées et placées entre deux feuille de Saran dans une cassette d'autoradiographie, 12 heures à -80°C en présence d'un film (Kodak). Après l'exposition et le développement du film, les clones sélectionnés sont prélevés et conservés à 4°C.

IV-2-4 : Purification de l'ADN phagique

L'ADN des clones phagiques sélectionnés est purifié par le Kit NucleoBond phage λ DNA purification (clontech). Ce kit permet de séparer les acides nucléiques des autres constituants cellulaires à l'aide d'une matrice d'extraction particulière. En général, le rendement est de 60 μg d'ADN phagique purifié.

IV-2-5 : Etude des clones phagiques

▪ Vérification de la présence des fragments clonés par DDRT au sein des inserts des clones phagiques sélectionnés.

La présence de ces inserts est vérifiée par une réaction de PCR. La réaction est réalisée dans un volume final de 25 μl , contenant 0.25 μl de chacune des deux amorces spécifiques du fragments d'intérêt (100pM), 2.5 μl de tampon 10X (avec du MgCl_2), 0.7 μl de dNTP (100 μM) et 7.5 U de Taq polymérase (*Promega*) selon le programme suivant : (2minutes à 95°C)+(45 secondes à 95°C + 45°secondes à 60°C + 50 secondes à 72°C) \times_{35} +(7 minutes à 72°C).

▪ Réalisation de la carte de restriction des clones phagiques sélectionnés.

La carte de restriction des clones phagiques s'effectue en deux étapes.

La première consiste en la **digestion simple** des clones phagiques par des enzymes possédant des sites de restrictions à chacune des extrémité du site multiple de clonage (CMS). Ainsi, l'insert est libéré de son vecteur et l'on peut déterminer son poids moléculaire et donc sa taille.

Pendant, la seconde étape, des **digestions simples ou doubles** sont réalisées à l'aide des enzymes reconnaissant des séquences situées au niveau du CMS. Ainsi une première orientation de l'insert dans l'ADN phagique et la présence de sites de restrictions particuliers en vue d'un sous clonage peuvent être déterminées.

- **Sous clonage**

L'insert est digéré par des enzymes de restrictions déterminés précédemment. Après migration, les fragments d'ADN digérés sont extraits du gel par le Kit Quiaquick (Qiagen). Ils sont ensuite insérés dans le vecteur PGEM-T EASY. Dans un volume final de 20 μ l, on ajoute 4 μ l de tampon 5X, 3 unités de T4 DNA ligase (Gico) 2 μ l de vecteur (préalablement linéarisés par les enzymes ayant servi à la digestion de l'insert) et 200ng d'ADN. Ce mélange est incubé à 15°C une nuit entière.

- **Séquencage**

Les sous-clones et le clone phagique sont séquencés selon le protocole précédemment décrit.

IV-2-6 Amplification rapide des extrémités 3' et 5' d'ADNc

Du fait de difficultés à séquencer de manière complète les clones phagiques sélectionnés lors du criblage de la banque d'ADN génomique de poulet, nous avons choisi la technique d'amplification rapide des extrémités 3' et 5' d'ADNc (3' RACE et 5'RACE). Cette technique est basée sur la synthèse d'ADNc à partir d'ARNm. La synthèse des premiers brins D'ADNc est réalisée à l'aide d'une amorce oligo(dT) modifiée et l'enzyme utilisée (MMLV reverse transcriptase) possède la capacité d'ajouter à l'extrémité 3' du brin d'ADNc néosynthétisé 3 à 5 résidus (préférentiellement des dCTPs). Ainsi, l'addition d'une amorce poly dG au niveau de la partie 3' de l'ADNc permet d'allonger la matrice pour la reverse transcription et donc permet l'incorporation au niveau de l'extrémité 3' de l'ADNc de toute la partie 5' de l'ARNm.

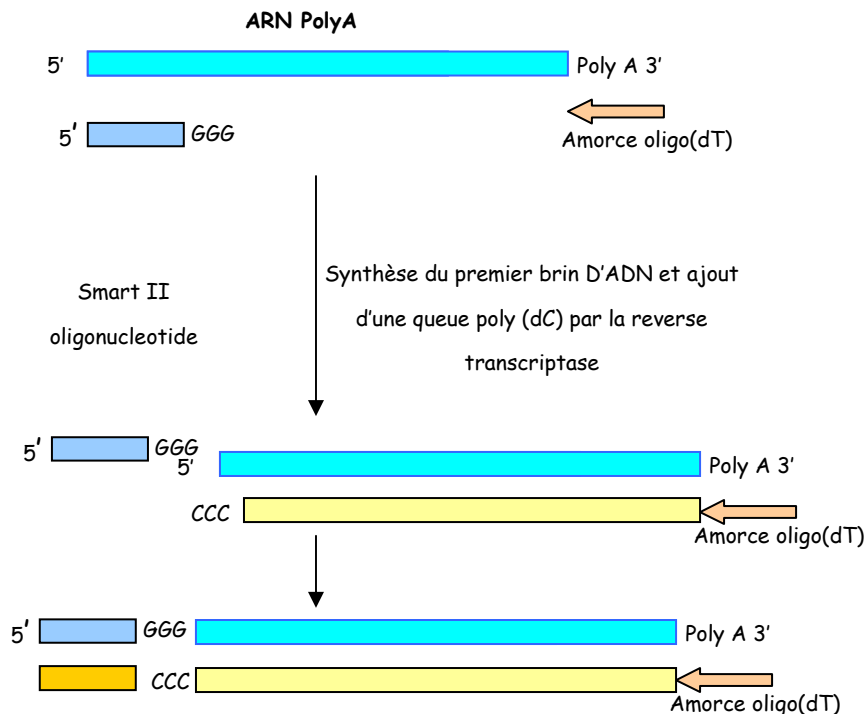


Schéma 4 : Principe de la synthèse du premier brin d'ADNc

Une fois les premiers brins d'ADNc synthétisés, l'amplification des extrémités 3' du gène d'intérêt est réalisée par PCR utilisant une amorce reconnaissant le polyA et une amorce spécifique du fragment isolé par DDRT.

Pour l'amplification de l'extrémité 5', le même principe est appliqué. Une réaction de PCR est effectuée à l'aide d'une amorce reconnaissant la queue greffée en 5' et un oligonucléotide spécifique de la séquence clonée par « differential display ».

IV-2-6-1 Extraction des ARNs.

Les épithélium olfactifs sont prélevés sur des embryons de poulet à un stade embryonnaire de 16 jours. Environ 4 épithéliums sont nécessaires à l'extraction d'une quantité suffisante d'ARNs. Tout comme pour le Northern blot, les ARNs totaux sont extraits à l'aide du Kit RNAgents Total RNA Isolation System (Proméga).

IV-2-5-2 Synthèse du premier brin d'ADNc et RACE

PCR

La synthèse du premier brin d'ADNc ainsi que les Race PCRs sont réalisées grâce au kit SMART™ RACE cDNA Amplification (Clontech).

Les amplifiats ainsi obtenus, sont étudiés de manière similaire aux fragments isolés par DDRT.

Résultats

I- Synthèse articulée des articles 1,2,3

Etude expérimentale du renouvellement neuronal au sein de l'épithélium olfactif aviaire :

Analyse de l'évolution de la réponse à l'axotomie des neurones olfactifs au cours du développement pré et postnatal

Les modifications de l'expression des principaux marqueurs de différenciation (COR et CamKII) et la maturation fonctionnelle de l'olfaction dans des conditions normales donne à penser que le bulbe a un rôle dans la différenciation terminale et la survie des neurones olfactifs. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence des facteurs bulbaires sur la survie et la différenciation des neurones olfactifs et avons testé l'effet de la déafférentation entraînant la rupture des interactions centro-périphériques.

Le poulet présente un intérêt particulier pour cette étude dans la mesure où le nerf olfactif est relativement long, superficiel et donc accessible à l'expérimentation pour effectuer une lésion axonale au voisinage du bulbe sans léser celui-ci aussi bien chez le poussin que chez l'embryon *in ovo*. Nous avons donc pu comparer les conséquences de l'axotomie chez l'embryon et le poussin mettant ainsi en évidence une différence majeure de la réponse avant et après l'éclosion. Nous avons analysé l'effet de facteurs susceptibles d'induire la survie des neurones lésés (IGF-1), et cherché à caractériser d'autres facteurs pouvant avoir un rôle protecteur des neurones olfactifs (COX-2). L'IGF-1 est un facteur de croissance produit dans les neurones de second ordre du bulbe et dont le récepteur est exprimé au niveau des neurones olfactifs et la COX-2 est une enzyme aux propriétés anti-oxydante inhibitrice d'apoptose *in vitro*. Nos

expériences ont apporté la preuve du rôle protecteur de l'IGF-1 lors de l'axotomie post-natale. La COX-2 pour sa part ne semble pas jouer un rôle anti-apoptotique au sein de l'épithélium olfactif à la suite de la lésion. Son expression chez l'embryon est principalement localisée dans des tissus non nerveux comme le rein ou l'aorte.

II- Article 1

Résumé de l'article 1.

Differential responses of olfactory neurons to deafferentation at embryonic and post-natal stages

M. Mathonnet, F. Lalloué, B. Petit, I. Comte, M.J. Leboutet, C. Ayer-Le Lièvre.

Neurosciences 2002. (109)2 :207-217.

Effet paradoxal de l'axotomie olfactive chez l'embryon :

L'axotomie du nerf olfactif, chez le poulet, provoque une diminution des deux principaux marqueurs de la différenciation des neurones olfactifs (COR et CaM Kinase II) et une stimulation de la neurogenèse et de l'expression de Cash I (Leibovici et al., 1996). Ainsi et afin d'étudier les phénomènes de neurogenèse et de mort neuronale existant au sein de l'épithélium olfactif, une étude comparative de l'effet de la déafférentation au niveau d'épithéliums d'embryons (immatures) et de poussin (matures) a été réalisée. La technique de détection d'apoptose (Tunel) a permis de mettre en évidence la mort neuronale, alors que le renouvellement des neurones a été détecté par l'incorporation de BrdU.

Ainsi, chez le poussin, donc au niveau d'un épithélium olfactif fonctionnel et mature, l'axotomie provoque une apoptose massive suivie, 24 heures plus tard, d'une vague mitotique dont le maximum est atteint 48 heures après la lésion. Au contraire

chez l'embryon, le nombre de cellules apoptotiques détectées est réduit, en tenant compte toutefois de l'exclusion d'un certain nombre d'entre elles dans la cavité nasale. De plus, même si une stimulation de la neurogenèse est observée 24 heures après la lésion, elle est relativement limitée.

Ces résultats semblent suggérer que la réponse des neurones olfactifs à la section du nerf dépend à la fois de leur degré de maturation mais aussi de leur environnement loco-régional. Les cellules neurosensorielles, avant l'éclosion, semblent moins sensibles à l'apoptose induite par la section de leurs axones qu'après l'éclosion. Cependant, l'axotomie semble provoquer une dédifférenciation des cellules neuronales indiquée par la diminution des cellules exprimant *COR* et *CamKII*. L'environnement de l'épithélium olfactif embryonnaire pourrait donc contenir les facteurs suffisants à la survie des neurones mais pas à leur différenciation.

Ces expériences indiquent l'interaction des processus de mort neuronale et de néo-neurogenèse. Ainsi, 24 heures après la lésion, la vague apoptotique est suivie d'une vague mitotique chez le poussin. Chez l'embryon, les effets promitotiques d'une telle lésion paraissent très limités. Ceci serait sans doute dû aux faibles pourcentages de neurones olfactifs complètement fonctionnels et dépendants des facteurs de survie bulbaires.

Manuscrit

III-Article 2

Résumé de l'article 2

Insulin-like growth factor I induced survival of deafferented olfactory neurons in the chick.

M. Mathonnet, I Comte, F.Lalloué and C. Ayer-Le Lièvre
Neurosciences Letters, 2001, 308(2) 67-70

Effet de l'IGF-I sur la survie des neurones olfactifs après déafferentation.

Le bulbe olfactif, considéré comme la source trophique des cellules neurosensorielles, produit de l'IGF-I. Le récepteur à ce facteur de croissance étant fortement exprimé au niveau de la placode et de l'épithélium olfactif, IGF-1 pourrait jouer un rôle dans les interactions bulbo-épithéliales ainsi que dans la plasticité du système olfactif (Ayer-Le Lièvre et al., 1995 ; Holzenberger et al., 1996 ; Holzenberger et al., 2000 ; Pixley et al., 1998).

Afin d'analyser le rôle de l'IGF-I au sein du système olfactif, et sachant que la section du nerf induit, dans l'épithélium mature, une vague apoptotique suivie

d'une vague mitotique, nous avons testé l'action de ce facteur de croissance durant cette période critique.

Suite à l'axotomie, l'application d'IGF-I, *in vivo*, au niveau de la lésion, a permis de mettre en évidence le rôle de ce facteur de croissance sur la survie, la prolifération et la différenciation des neurones olfactifs. La méthode TUNEL, nous a permis de détecter l'apoptose, l'incorporation de BrdU, la multiplication cellulaire et l'analyse immunohistochimique de l'expression de la CaM KII, la différenciation.

L'ensemble des résultats suggèrent que l'IGF-I possède un effet anti-apoptotique à long terme au sein de l'épithélium olfactif. Son application lors de la lésion garantit, en effet, la survie des neurones pendant au moins 5 jours. Cependant l'effet d'IGF-1 sur la prolifération et le maintien de la différenciation neuronale apparaît limité dans le temps à environ 24 heures.

Manuscrit

IV-Article 3

Résumé de l'article 3 :

Cyclooxygénase 2 tissue distribution and developmental pattern of expression in the chicken.

M. Mathonnet, F. Lalloué, E. Danty, I. Comte, C. Ayer-Le Lièvre.

Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2001,
28 :425-432

La cyclooxygénase-2 joue un rôle majeur dans la morphogenèse du rein et de l'aorte mais n'est pas exprimée dans l'épithélium olfactif même après axotomie.

La cyclooxygénase-2 (COX-2) est connue pour avoir une activité anti-apoptotique *in vitro* (Tsuji et Dubois, 1995). Il était donc envisageable que cette enzyme puisse jouer un rôle anti-apoptotique au niveau de l'épithélium olfactif dans des conditions physiologiques ou après section du nerf olfactif.

Afin de déterminer l'action de la COX-2 au sein du système olfactif, nous avons analysé son expression au sein de l'épithélium, après axotomie mais également chez l'embryon entier durant le développement.

Les résultats obtenus suggèrent que COX-2 est exprimée chez l'embryon de poulet au cours de la morphogenèse du rein et de l'aorte à des stades précis de leur développement. Cependant, aucune expression de cette enzyme n'apparaît au sein de l'épithélium olfactif normal ou après axotomie. Contrairement à l'IGF-1, la cyclooxygénase 2 n'interviendrait donc pas comme un facteur anti-apoptotique, ni dans les conditions physiologiques normales, ni dans les conditions expérimentales c'est-à-dire après lésion du nerf induisant l'apoptose massive des neurones lésés.

Manuscrit :

V-Synthèse articulée des articles 4,5,6

Etude de la neurogenèse au sein de l'épithélium olfactif

aviaire :

Analyse cellulaire du lignage neuronal

Le système olfactif est capable de renouveler les neurones qui le constituent tout au long de la vie d'un individu et ceci par stimulation de cellules souches présumées localisées dans la partie basale de l'épithélium. Cependant l'identité de ces cellules est encore inconnue et leur existence discutée.

Dans le but de caractériser ces cellules souches, nous avons au préalable isolé des marqueurs spécifiques des différents types cellulaires coexistant au sein de l'épithélium olfactif aviaire. Au cours de cette étude, nous avons montré que les cellules basales horizontales (HBCs) et les cellules de soutien exprimaient la kératine tout comme les données concernant les mammifères nous l'avaient laissé envisager. La kératine s'est montré, au cours de cette étude, être un excellent marqueur permettant non seulement d'identifier les cellules de soutien, mais également de définir les grandes étapes de la maturation de l'épithélium au cours du développement. De plus lors de cette étude, une relation unissant les HBCs (identifiées par la double expression kératine/TrkA) et les grandes étapes de la neurogenèse a pu être observée.

Nous avons donc, dans un second temps, isolé par la technique de SdFFF (sedimentation Field Flow Fractionation), les cellules basales horizontales et étudié leur comportement *in vitro*. Il apparaît au vu des résultats obtenus que les HBCs sont bien les cellules souches de l'épithélium olfactif. Leur prolifération semble stimulée par le NGF, alors que le FGF2 activerait plutôt la division des cellules basales globulaires

(GBCs). En outre l'étude de l'expression de Fas au niveau de cultures primaires de cellules olfactives humaines laisse envisager l'hypothèse selon laquelle ce récepteur intervenant dans la mort neuronale aurait un rôle clé dans l'interaction entre la mort et la neurogenèse existant au sein du système olfactif périphérique.

VI-Article 4

Résumé de l'article 4

Developmental changes of keratin expression pattern in the olfactory epithelium of chick embryo in relation with cellular differentiation and neurogenesis in vivo and in vitro.

I Comte, M. Mathonnet, G. Chevalier, C Ayer-Le Lièvre.

Brain Research Developmental Brain Research (Accepté avec modifications mineures)

Relation entre l'expression de la kératine au cours du développement de l'épithélium olfactif chez l'embryon de poulet, la différenciation cellulaire et la neurogenèse *in vitro* et *in vivo*.

Chez les rongeurs les kératines 5, 14, 8 et 18 sont exprimées au niveau des cellules de soutien (K8 et K18) et des cellules basales horizontales (K5 et K14) de l'épithélium olfactif. Devant le manque de marqueurs des différents types cellulaires qui coexistent au sein de l'épithélium olfactif aviaire, nous avons étudié l'expression par immunohistochimie de la kératine durant la morphogenèse de ce tissu.

L'ensemble des résultats obtenus suggèrent que le changement du motif d'expression de la kératine au niveau de l'épithélium olfactif, durant le développement, coïncide avec les grandes étapes de la morphogenèse olfactive. En effet, jusqu'au

cinquième jour de la vie embryonnaire, l'épithélium olfactif tout comme l'épithélium respiratoire exprime fortement cette protéine. Mais durant les premières étapes de la neurogenèse (du stade E5 au stade E8), les cellules situées dans la partie basale de l'épithélium n'expriment plus la kératine. Lorsque débute la synaptogenèse périphéro-centrale olfactive, une nouvelle sous-population de cellules localisées dans la partie la plus basale de l'épithélium commence à exprimer la kératine. Ainsi, au niveau d'un épithélium olfactif de E14 qui possède l'ensemble des cellules différenciées nécessaires à sa fonctionnalité, deux types cellulaires expriment la kératine. Ces cellules ont tout d'abord été identifiées par leur morphologie et leur localisation au sein de l'épithélium puis leur identité a été vérifiée *in vitro*. Ces résultats indiquent donc que les cellules de soutien et les cellules basales horizontales (HBCs) de l'épithélium olfactif aviaire expriment la kératine.

Il a été également noté que le nombre de cellules basales exprimant la kératine est moins important dans la partie profonde de la cavité nasale que dans la partie médiane de l'épithélium recouvrant le cornet nasal supérieur. Cette partie médiane de l'épithélium étant la zone possédant le plus de cellules neurosensorielles et donc la plus active durant la neurogenèse, ces observations suggèrent le rôle important des HBCs dans les processus de neurogenèse. Ainsi, l'expression de la kératine par les HBCs pourrait correspondre à une spécialisation de ces cellules nécessaire à leur implication dans de tels processus.

Manuscrit

VII- Article 5

Résumé de l'article 5

Purified Olfactory Horizontal Basal Cells act as Stem cells in vitro

Comte I, Battu S, Mathonnet M, Bessette B, Lalloué F, Cardot P, and Ayer-Le Lièvre C.

(En préparation)

Les cellules basales horizontales olfactives purifiées se comportent *in vitro* comme des cellules souches.

Le système olfactif possède la caractéristique unique de pouvoir renouveler ses neurones sensoriels tout au long de la vie de l'individu et ceci par la stimulation de cellules souches neurales présentes dans la partie basale de l'épithélium. Cependant, l'identité de ces cellules souches reste mal connue. Deux types de cellules sont localisées dans la partie basale de l'épithélium: les cellules basales horizontales (HBCs) et les cellules basales globulaires (GBCs). Des études *in vitro* ont montré que les HBCs pouvaient donner naissance à des neurones olfactifs, et les GBCs semblent faire partie intégrante du lignage neuronal. Ainsi, dans le but de mieux comprendre les phénomènes

impliqués dans le renouvellement neuronal, nous avons isolé par la technique de SdFFF, les HBCs de l'épithélium olfactif. Ce tri est basé sur les différences morphologiques des quatre types cellulaires qui coexistent au sein de l'épithélium olfactif, à savoir : des cellules de soutien de type fibroblastique, des neurones matures et immatures ainsi que les GBCS et les HBCs. Le système olfactif aviaire a été choisi dans la mesure où il est relativement facile d'accès et où il permet de comparer la neurogenèse au cours de l'embryogénèse et durant la vie adulte.

Nous avons montré au cours de cette étude que les cellules isolées par SdFFF étaient effectivement des HBCs. De plus, selon les concentrations auxquelles elles sontensemencées, elles sont capables de se différencier en cellules formant un épithélium de type cuboïdal (morphologiquement identiques aux cellules formant la placode olfactive) ou de former directement des neurosphères au niveau desquelles on peut observer, au bout de trois semaines en culture, une projection radiaire d'axones de neurones matures. Ces cellules isolées par SdFFF possèdent également les caractéristiques communes à l'ensemble des cellules souches. Elles ont un caractère indifférencié et pluripotentiel et sont capables d'auto renouvellement. De plus la prolifération de ce type cellulaire est stimulée par le NGF, alors que le FGF2 semble agir plutôt sur la prolifération des précurseurs neuronaux. Ainsi, il semblerait que les HBCs se comportent bien *in vitro* comme des cellules souches neuronales confirmant l'hypothèse de l'identité des HBCs comme cellules souches neuronales olfactives, déduite des observations de l'expression de la kératine. Toutefois, nous ne savons pas si ces cellules purifiées ont un comportement similaire *in vivo*. Ainsi, les expériences en cours de greffes de ces cellules au sein du système nerveux central, devraient nous permettre de mieux comprendre leur comportement *in vivo*.

Manuscrit

VI- Article 6

Résumé de l'article 6

Fas expression by neurosphere-forming cells from human primary olfactory cell in vitro

I. Comte, C. Lautrette, A. Alfieri, J.J.Moreau, M.O.

Jauberteau and C. Ayer-Le Lièvre.

Neuroscience letters (en soumission)

Expression de Fas par les cellules des neurosphères obtenus à partir de cultures primaires de cellules olfactives humaines.

Le récepteur Fas et son ligand naturel Fas L, ont été décrits initialement dans des processus d'apoptose lymphocytaires. Mais récemment, l'intervention de ce récepteur a été observée dans d'autres types cellulaires (notamment neuronal) ainsi qu'au niveau de processus tels que la régénération, l'activation et la prolifération cellulaire. D'autre part le système olfactif possède la capacité unique de pouvoir remplacer ses neurones sensoriels tout au long de la vie ceci à partir d'une population de cellules souches situées dans sa partie basale. Les processus de mort neuronale et de

neurogenèse doivent donc interagir étroitement de manière à maintenir la quantité de neurones, au sein de l'épithélium olfactif. Ainsi, au cours de ces travaux, nous avons cherché à déterminer si le récepteur Fas était exprimé au niveau de cultures primaires de cellules olfactives humaines et ceci par des techniques d'immunocytochimie. Ainsi nous avons pu montrer que le récepteur Fas était exprimé par les cellules composant des neurosphères. Par comparaison avec les observations de l'expression de ce récepteur par immunofluorescence indirecte sur une lignée neuroblastique humaine, il semblerait qu'il soit exprimé au niveau de cellules neuronales relativement immatures. Ce récepteur pouvant être impliqué dans l'apoptose ou dans la prolifération cellulaire, une hypothèse a pu alors être émise. Les cellules olfactives neuronales immatures formant les neurosphères possèdent la capacité de se diviser. D'autre part la prolifération de ces cellules est activée par l'EGF. Ce signal d'activation est médié par la voie des MAPKinases, tout comme le signal de prolifération activé par Fas. Ainsi, Fas pourrait agir sur la prolifération des cellules composant les neurosphères via la voies des Mapk. Fas pourrait donc être un élément clé régissant l'interaction entre les processus de mort neuronale et de neurogenèse au sein de l'épithélium olfactif.

Manuscrit

IX- RÉSULTATS PRÉLIMINAIRES DES DIFFÉRENTS TRAVAUX EN COURS

IX-1: Isolation de nouveaux marqueurs

IX-1-1 : Introduction

Au cours de l'ensemble de ces travaux, nous avons choisi le modèle aviaire comme modèle d'étude de la neurogenèse au sein du système olfactif périphérique . Ce modèle a été choisi du fait de l'accessibilité relativement aisée :

- ❖ de l'épithélium olfactif
- ❖ du nerf olfactif, unique de chaque côté, plus long que chez les mammifères et facilement manipulable du fait de sa localisation relativement superficielle.
- ❖ des embryons permettant ainsi l'étude expérimentale comparée de la neurogenèse avant et après l'éclosion.

Cependant, nous nous sommes heurtés durant cette étude au manque de marqueurs spécifiques des différents types cellulaires coexistant au sein de l'épithélium, notamment pour les cellules souches olfactives. Le but de cette étude a donc été de rechercher de nouveaux marqueurs permettant de mieux comprendre les phénomènes à la base du renouvellement neuronal et régulant l'équilibre entre la mort neuronale et la neurogenèse au niveau du système olfactif périphérique.

IX-1-2 : Démarche expérimentale :

La neurogenèse et la mort neuronale sont des événements relativement liés au sein de l'épithélium olfactif. En effet, une dégénérescence massive des neurones olfactifs provoque une neurogenèse accrue par stimulation des cellules souches localisées dans la partie basale de l'épithélium.

Ainsi, dans le but d'entraîner une mort neuronale massive des cellules neurosensorielles et donc en retour d'induire une stimulation des cellules souches olfactives, nous avons choisi de réaliser une section du nerf olfactif sur des embryons de poulet de 16 jours. En effet, même si des études ont montré que l'axotomie provoquait une dégénérescence et un renouvellement neuronal relativement plus faible chez l'embryon, la possibilité d'avoir accès à un plus grand nombre de spécimens, et l'hypothèse selon laquelle les cellules souches seraient plus actives chez l'embryon que chez le poussin nouveau-né ou adulte, nous ont poussés à étudier ces processus, en premier lieu, chez l'embryon de poulet.

Dans l'espoir d'isoler de nouveaux gènes impliqués dans les processus de neurogenèse et de mort neuronale, la technique de « differential display » ou DDRT a été utilisée. Au cours de l'application de cette technique, basée sur l'expression différentielle de gènes dans deux conditions physiologiques ou expérimentales différentes, nous avons comparé les gènes exprimés dans les conditions normales et donc au moment de la section du nerf et ceux exprimés 24 heures après la lésion. Ainsi, les gènes uniquement exprimés ou surexprimés 24 heures après la lésion, correspondent à des protéines impliquées soit dans la mort soit dans le renouvellement neuronal.

A partir des ARNs totaux extraits dans ces deux conditions, des fragments d'ADN complémentaires ont été synthétisés. Cette synthèse a été réalisée en utilisant des amorces oligoD(T)s et décamériques aléatoires. Les fragments de gènes ainsi obtenus ont été visualisés par migration sur gel de polyacrylamide . Les amplifiats spécifiques de l'une des deux conditions ont été retenus et amplifiés à nouveau par PCR,

en utilisant les amorces ayant permis de les générer. Sur 457 fragments sélectionnés, l'étude et la caractérisation de trois d'entre eux appelés Cas6, HypA6 et LR13 m'ont été confiés.

IX-1-3 : Etude de l'expression spatio-temporelle des gènes correspondants aux fragments isolés par DDRT :

Cette étude est menée en parallèle avec le séquençage des fragments et la comparaison de ces séquences aux banques de données. Dans le cadre de cette analyse, nous avons au préalable vérifié que ces gènes étaient bien exprimés au sein de l'épithélium olfactif. Puis l'étude a été étendue à l'ensemble du système nerveux durant tout le développement embryonnaire.

IX-1-3-1 : Cas6

Le gène correspondant à ce fragment de 621pb semble exprimé dans le tiers basal de l'épithélium olfactif d'un embryon de 16 jours (E16) (Figure1A) Comme, les cellules marquées se situent à la base de l'épithélium olfactif, il pourrait donc s'agir du fait de la structure pseudo-stratifiée de l'épithélium, de cellules souches ou de précurseurs neuronaux. Un motif comparable a pu être observé à partir du stade E10 jusqu'à l'éclosion. Cependant, nous ne sommes pas en mesure de déterminer formellement si ce gène est surexprimé lors de la lésion du nerf, en effet de faibles différences d'expression ne peuvent être appréhendées avec certitude par la technique d'hybridation in situ.

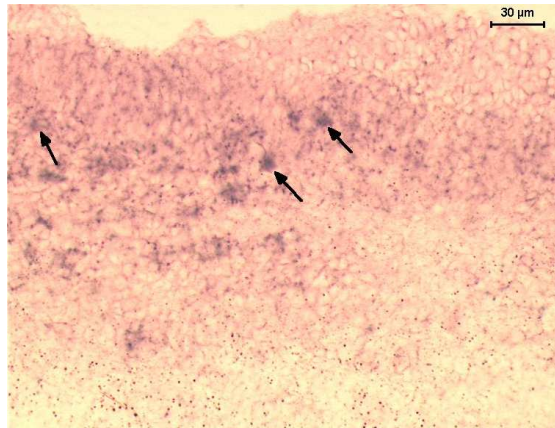


Figure1A: Marquage par la sonde anti-sens Cas6 au niveau de l'épithélium olfactif opéré (E16)

De plus, en dehors du système olfactif périphérique, plusieurs types de cellules neuronales sont marquées. C'est le cas d'une sous population de cellules épithéliales du plexus choroïde (Figure1B).

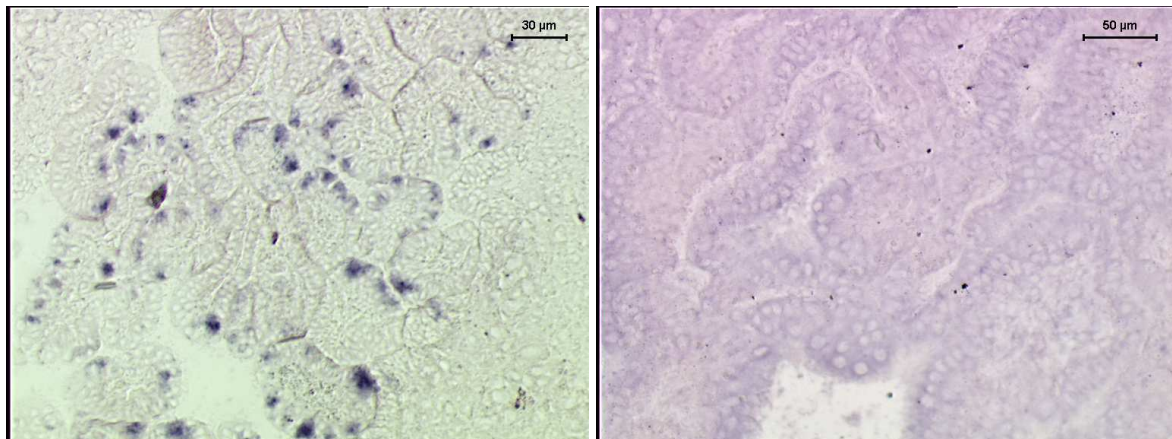


Figure1B: Marquage par la sonde anti-sens Cas6 au niveau du plexus choroïde (E16).

Figure1C: Marquage par la sonde sens Cas6 au niveau du plexus choroïde (E16).

Le gène correspondant à Cas6 s'exprime également dans la partie médiane de la rétine. Toutefois, à ce niveau, le marquage n'est pas uniforme. En effet, les transcrits n'apparaissent produits que dans des régions bien définies de la rétine comportant des cellules gliales et des interneurons dont certains sont encore en cours de différenciation Ce marquage est observé dès le 10^{ème} jour de la vie embryonnaire et se poursuit jusqu'à la naissance (Figure1D). De plus, la sonde anti-sens spécifique du fragment Cas6 marque des cellules situées au niveau du système nerveux central et plus

particulièrement au niveau des zones péri ventriculaires. La localisation de ce marquage semble correspondre à celle des cellules souches neurales (Figure1E) connues pour migrer selon des voies déterminées (Luskin et al., 1993) pour fournir des neurones granulaires du bulbe olfactif.

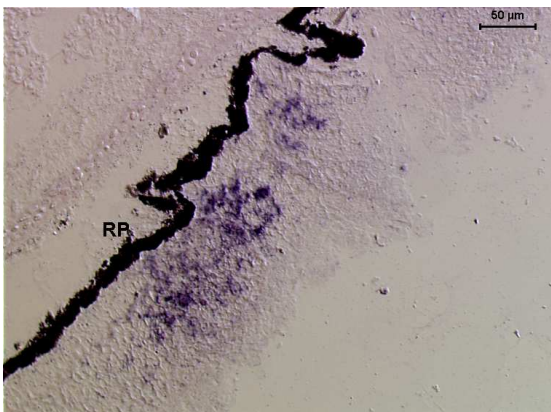


Figure1D: Marquage par la sonde anti-sens Cas6 au niveau de la rétine (E16).



Figure1E: Marquage par la sonde anti-sens Cas6 au niveau des zones périventriculaires (E16).

Enfin, il est important de noter que lors de la comparaison de la séquence correspondant au fragment Cas6, avec les séquences fournies dans les banques de données, aucune homologie avec la séquence de gènes connus ou d'ESTs n'a pu être détectée. Ce gène pourrait donc coder une protéine encore inconnue.

IX-1-3-2 : HypA6

Le gène correspondant à ce fragment de 621pb est faiblement exprimé au niveau de l'épithélium olfactif, du côté de l'axotomie. Les cellules marquées se situent dans les parties basale et moyenne du neuro-épithélium. La localisation de ces cellules semble correspondre à celle des corps cellulaires des précurseurs neuronaux ou des

neuroblastes immatures (Figure2A). Il semblerait qu'un marquage légèrement moins intense soit observé du côté non opéré. Cependant, la technique d'hybridation *in situ* n'étant pas une technique quantitative, nous ne pouvons tirer aucune conclusion définitive concernant les différences d'intensité du marquage observé. Le marquage de faible intensité de cellules localisées au niveau de l'épithélium est également observé seulement 3 heures et 6 heures après la lésion du nerf dans les parties médianes et basales.

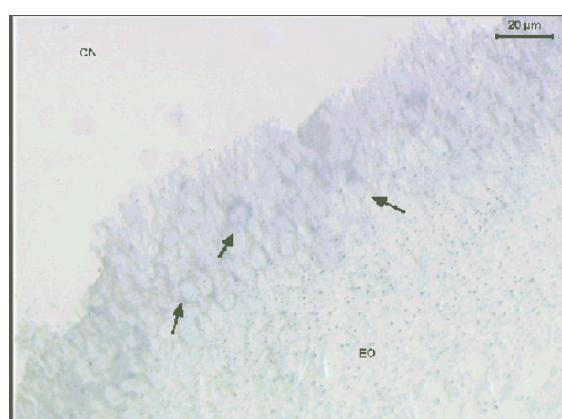


Figure2A : Marquage par la sonde anti-sens HypA6 des cellules de l'épithélium olfactif (E16).

D'autre part des motifs d'expression correspondants à ce gène apparaissent également au niveau de l'hyperstriatum d'un embryon de 15 jours (E15). Dans ce cas le marquage est péri-nucléaire et permet la visualisation de neurones à gros noyaux présents dans cette région (Figure2B). A ce stade embryonnaire, les neurones localisés au niveau de l'hyperstriatum sont en principe largement post-mitotiques, il s'agit donc ici de cellules différenciées. Lors de l'analyse de l'expression de ce gène au cours du développement, un marquage similaire a été observé au niveau de l'hyperstriatum d'embryons de 10 jours (E10) et ce marquage reste constant jusqu'à la naissance. De plus, l'absence de ce type de marquage sur des coupes traitées par la sonde sens démontre la spécificité de l'hybridation de la sonde anti-sens.

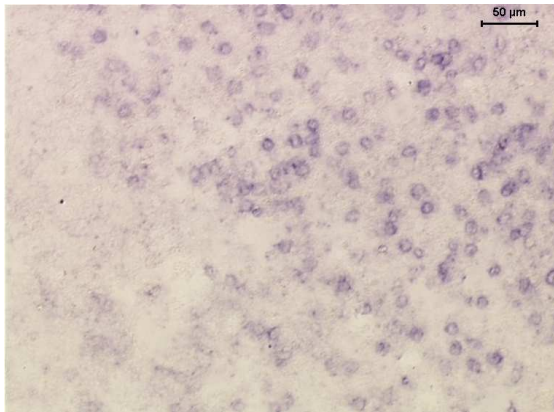


Figure 2B: Marquage par la sonde anti-sens au niveau de l'hyperstriatum (E16).

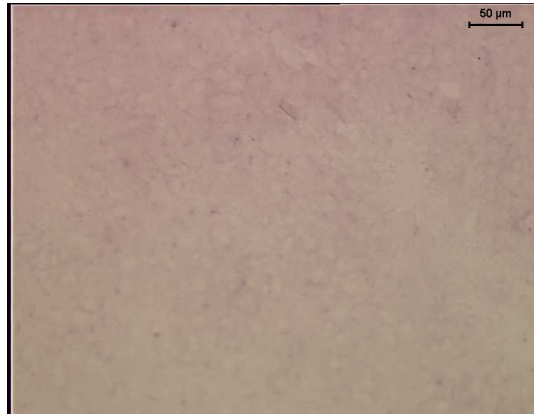


Figure 2C: Marquage par la sonde sens au niveau de l'hyperstriatum (E16).

Le gène correspondant au fragment HypA6 apparaît également exprimé au niveau de la rétine d'un embryon de 15 jours (E15). Les cellules marquées apparaissent localisées selon trois bandes caractéristiques (Figure 2D). Une première bande est située dans la partie basale proche de la rétine pigmentée et correspond à la localisation des corps des futures cellules amacrines (a). La deuxième bande localisée dans la partie médiane semble correspondre à la zone où sont situés les neurones horizontaux encore immatures (h). Enfin, au niveau de la troisième bande, la plus apicale, seules quelques cellules semblent exprimer ce gène. Elles correspondraient à une sous-population de cellules ganglionnaires (Figure 2E). Un marquage similaire est observé à partir du 10^{ème} jours de la vie embryonnaire (E10) et persiste jusqu'à la naissance.

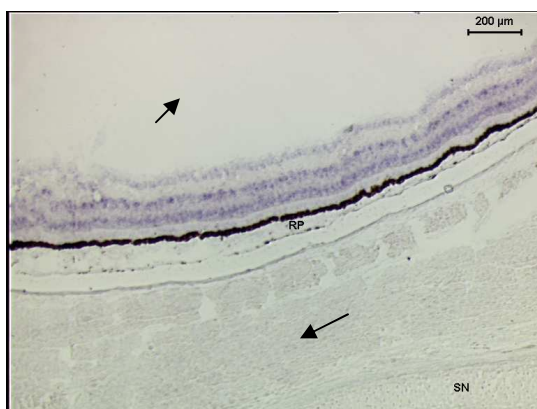


Figure 6D: Marquage de la rétine par la sonde anti-sens spécifique d'HypA6 (faible grossissement).

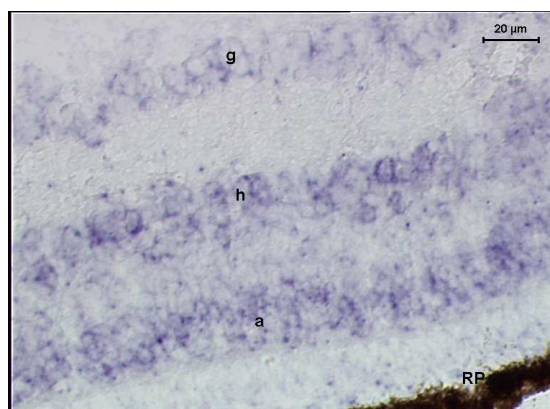


Figure 6E: Marquage de la rétine par la sonde anti-sens spécifique d'HypA6 (fort grossissement).

De plus, lors des études systématiques sur l'ensemble du système nerveux central au cours du développement, un marquage cellulaire, correspondant au gène HypA6 et localisé au niveau de la moelle épinière a pu être observé. Au stade embryonnaire E16, ce marquage est localisé à la périphérie du canal de l'épendyme et s'étend à la partie postérieure de la moelle épinière. Il est à noter, que le motif d'expression du gène HypA6 varie dans ce tissu au cours du développement. En effet, à E10, les cellules marquées ne sont localisées qu'à la proche périphérie du canal de l'épendyme. Puis le marquage s'étend par la suite progressivement à toute la moelle épinière avec toutefois un marquage qui apparaît plus intense à la périphérie du canal. Ce type de marquage persiste jusqu'à la naissance.

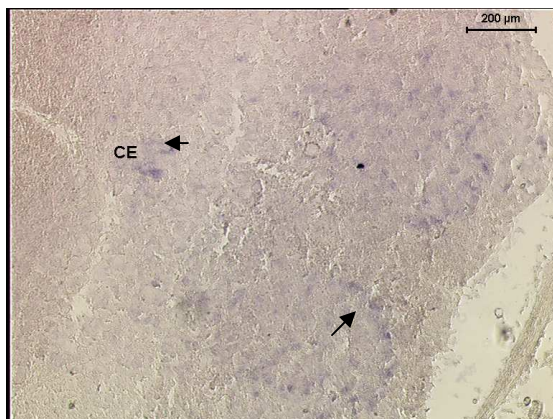


Figure2F: Marquage par la sonde anti-sens spécifique d'HypA6 de la moelle épinière (E16). Ce : canal de l'épendyme

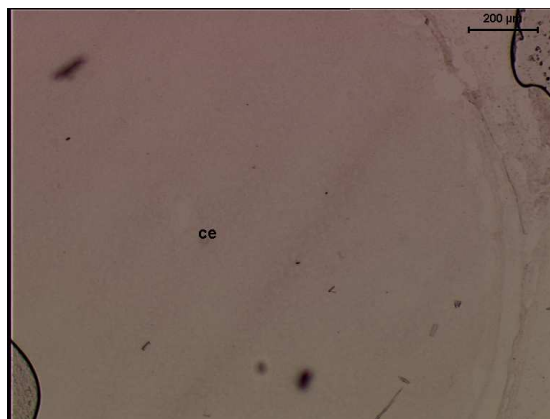


Figure2G: Marquage par la sonde sens spécifique d'HypA6 au niveau de la moelle épinière (E16). Ce : canal de l'épendyme

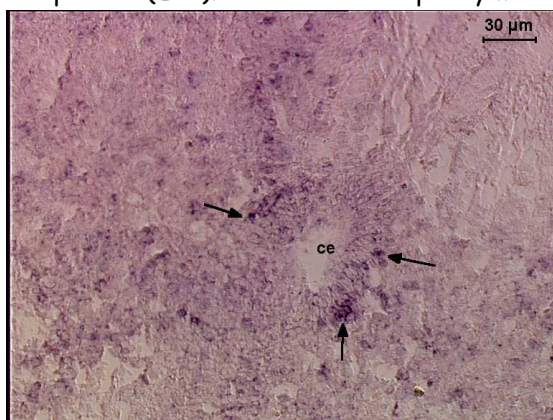


Figure2H: Marquage par la sonde anti-sens spécifique d'HypA6 au niveau de la moelle épinière (E10).

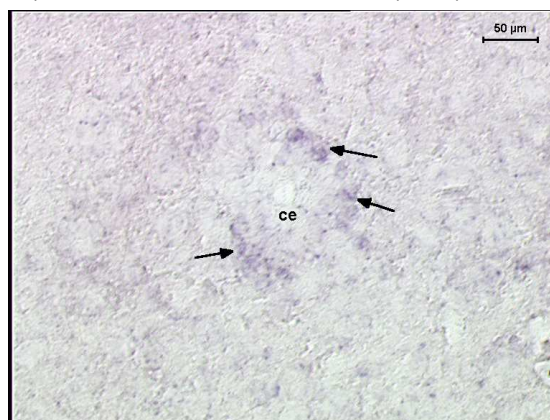


Figure2I: Marquage par la sonde anti-sens HypA6 au niveau de la moelle épinière (E18).

L'ensemble de ces motifs d'expression n'est pas observé lorsque la sonde sens est utilisé. Le marquage obtenu avec la sonde anti-sens est donc spécifique.

Enfin, les analyses bioinformatiques visant à comparer la séquence isolée avec celles des gènes répertoriés dans les banques de données, indiquent une similitude d'environ 80% entre la séquence nucléique d'HypA6 et celle de la sous unité a du canal calcique de type T précédemment clonée chez le rat.

IX-1-3-3 : LR13

Le gène correspondant au fragment LR13 de 973pb est exprimé au niveau de la partie la plus basale de l'épithélium olfactif d'un embryon de poulet au stade E16. Cependant, il ne s'agit dans ce cas que de rares cellules marquées dont la localisation semble correspondre à celles des cellules souches présumées du système olfactif périphérique (Figure3A) c'est à dire à la localisation des cellules basales horizontales. Un marquage identique est observé à partir du 10^{ème} jours de la vie embryonnaire et se poursuit jusqu'à la naissance. Il ne semble y avoir aucune variation de l'intensité du marquage et du nombre de cellules marquées au cours du développement.

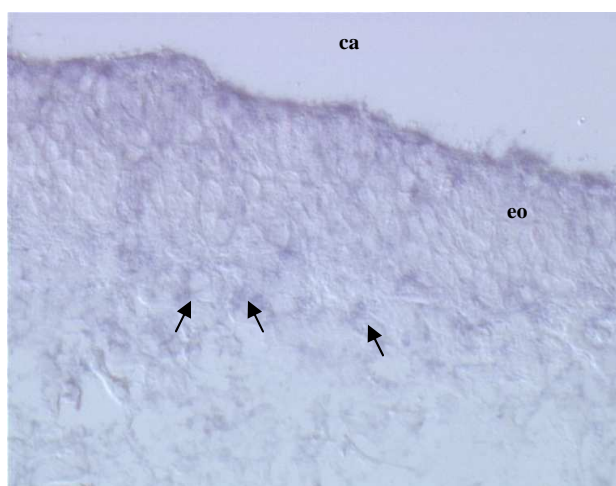


Figure3A: Marquage par la sonde spécifique de LR13 de rares cellules au niveau de la partie basale de l'épithélium olfactif (E16).

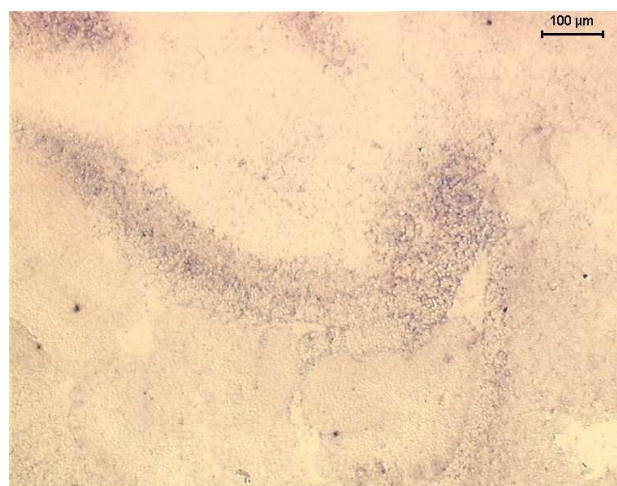


Figure3B: Marquage par la sonde anti-sens spécifique de LR13 des cellules péri-ventriculaires (E16).

Il est également à noter que ce gène, outre au niveau du système olfactif périphérique, est également exprimé au sein de cellules bordant les ventricules latéraux du système nerveux central au stade E16. Cette zone spécifique du cerveau est entre autre la zone où sont situées les cellules souches neurales responsables de la formation d'un grand nombre de neurones. Ce marquage qui débute au 7^{ème} jours de la vie embryonnaire persiste jusqu'à la naissance. De plus, ce gène apparaît également exprimé au niveau des cellules bordant le canal de l'épendyme. Contrairement à ce qui a été observé pour HypA6, aucune variation concernant ce marquage n'a pu être détectée au cours du développement (Figure 3C).



Figure 3C: Marquage des cellules bordant le canal de l'épendyme par la sonde anti-sens spécifique de LR13 (E16).

Enfin, la comparaison de la séquence nucléique correspondant au fragment LR13, avec celles de l'ensemble des gènes connus, a permis de montrer que ce fragment présente une homologie de 68 % avec le gène codant la protéine NFIA clonée chez le rat.

IX-1-4 Clonage des gènes correspondant aux fragments isolés par DDRT

De manière à déterminer la séquence entière des gènes correspondants aux fragments d'intérêt isolés par DDRT, nous avons choisi dans un premier temps de cribler une banque d'ADN génomique de poulet. Ce premier choix a été basé sur le fait que le criblage d'une telle banque permet d'obtenir la séquence nucléique entière c'est-à-dire des régions codantes et non codantes du gène correspondant aux fragments isolés par DDRT. Cependant devant la difficulté de séquençage des clones phagiques isolés, nous avons tenté une autre approche visant à déterminer seulement la séquence nucléique codante des gènes d'intérêt. Pour cela nous avons choisi les techniques de 3' et 5' Race. En effet, ces techniques permettent un clonage rapide du gène d'intérêt et comme elles sont basées sur la technique de PCR, permettent d'isoler des gènes même faiblement exprimés.

IX-1-4-1 : Criblage de la banque d'ADN génomique :

Avant de réaliser le criblage de la banque d'ADN génomique, nous avons vérifié que la sonde réalisée à partir du fragment isolé par DDRT, ne se situait pas à cheval sur deux exons, pour cela deux expériences différentes ont été réalisées. La première a consisté à réaliser un Southern blot sur de l'ADN génomique provenant d'embryons de poulet .

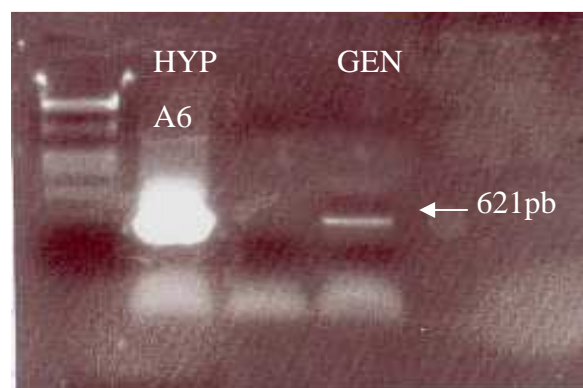
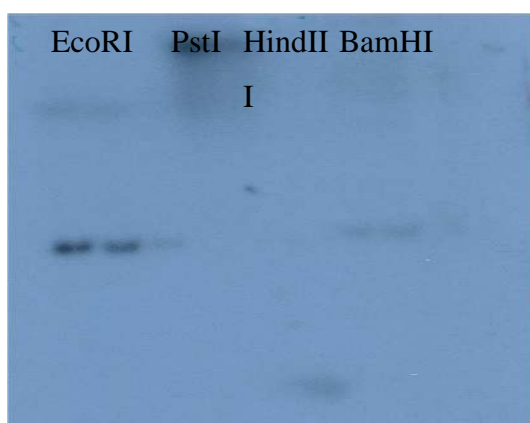


Figure 4: Southern blot sur ADN génomique de poulet digéré par EcoRI, PstI, Hind II, BamHI (Sonde spécifique d'HypA6)

Figure5: PCR sur ADN génomique de poulet avec amorces spécifiques d'HypA6. (HYP : ADN plasmidique contenant HypA6 ; GEN : ADN génomique).

La seconde consiste à vérifier que la taille de l'amplifiat obtenu après PCR sur de l'ADN génomique correspond bien à la taille des fragments d'intérêt clonés par DDRT. Ainsi, par exemple concernant l'étude du fragment HypA6, l'analyse par Southern blot a montré que la sonde radioactive générée à partir de ce fragments d'intérêt s'hybridait bien avec de l'ADN génomique. De plus, La taille de l'amplifiat généré par PCR en utilisant les amorces spécifiques d'HypA6 est identique à celle du fragment isolé par DDRT c'est-à-dire de 621pb. L'ensemble de ces résultats suggère donc que le fragment HypA6 cloné à partir d'ADNc ne se situe pas à cheval sur deux exons. Une démarche similaire a été réalisée pour les fragments Cas6 et LR13 qui semblent ne pas être localisés sur deux exons différents.

Suite au criblage de la banque d'ADN génomique, 8 clones phagiques ont été sélectionnés et semblaient contenir le fragment HypA6, 6 clones phagiques ont été isolés et semblaient comprendre le fragment Cas6 et 2 clones phagiques ont été étudiés pour le fragment LR13. Nous avons vérifié que l'ADN de ces phages comprenaient bien les fragments d'intérêt par Southern blot (Figure6). Ainsi sur les 8 clones sélectionnés après le criblage de la banque par une sonde radioactive spécifique d'HypA6, seuls 4 clones semblent réellement contenir le fragment d'intérêt. 2 clones et 1 clone ont respectivement été sélectionnés pour les fragments Cas6 et LR13 selon une démarche expérimentale similaire.

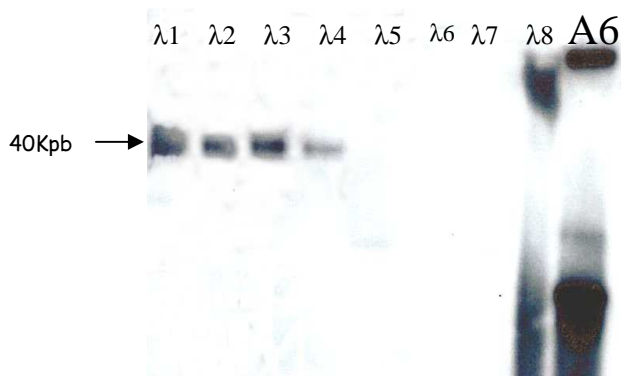


Figure6 : Southern blot sur ADN phagiques purifié. (Sonde radioactive spécifique de HypA6).

A6 : ADN plasmidique contenant le fragment HypA6. Phages positifs contenant le gène d'intérêt $\lambda 1$ à 4.

Après avoir réalisé la carte de restriction de l'ensemble de ces clones phagiques, seuls deux clones différents apparaissent contenir le fragment HypA6, 1 clone le fragment Cas6 et 1 clone le fragment LR13.

Cependant, nous nous sommes heurtés à des difficultés de séquençage dues notamment au fort pourcentage de GC contenu dans les séquences nucléiques correspondants aux phages étudiés. C'est la raison pour laquelle, nous avons choisi, une nouvelle démarche expérimentale visant à n'isoler que la séquence codante des gènes correspondants aux fragments d'intérêts.

IX-1-4-2 : 3' et 5' Race :

Devant les difficultés rencontrées concernant le séquençage des différents clones phagiques sélectionnés, nous avons choisi d'utiliser une nouvelle démarche expérimentale. Notre choix s'est porté sur la technique d'amplification rapide des extrémités des ADNc, car cette technique est rapide et permet d'amplifier des gènes qui ne sont exprimés qu'à de faibles taux dans les tissus ou les cellules étudiées.

Ainsi concernant l'étude du gène correspondant à HypA6, nous n'avons réussi à amplifier que l'extrémité 5' de ce gène (Figure7). Concernant l'extrémité 3', aucun amplifiat n'a pu être obtenu. En comparant la séquence de 926pb amplifiée par 5' RACE avec les séquences nucléiques des gènes répertoriés dans les banques de données, nous avons confirmé les résultats obtenus précédemment, à savoir que ce gène possédait une

homologie de séquence d'environ 84% avec le gène codant la sous-unité alpha 1G du canal calcique de type T cloné chez le rat.

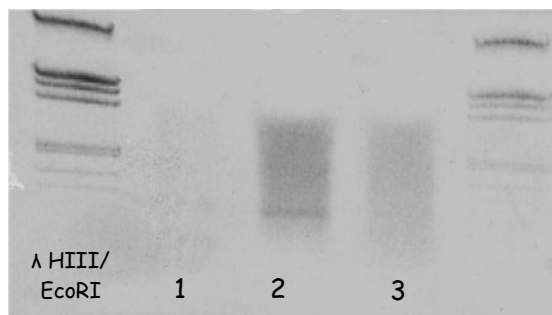


Figure 7: migration sur gel TBE 0,5X agarose 1,5% des produits de RACE PCR réalisés à partir d'ADNc d'épithélium olfactif (E16). 1 : Témoin négatif ; 2 : amplifiat résultant de la 5'RACE PCR ; 3 : aucun amplifiat observé résultant de la 3'RACE PCR.

Aucun amplifiat correspondant aux fragments LR13 et Cas6 n'a pu être obtenu.

IX-1-5 Discussions et perspectives

Le gène correspondant à la séquence **CAS6** est exprimé au niveau de la partie basale de l'épithélium olfactif et pourrait être surexprimé lors de la lésion du nerf. Il est toutefois à noter que l'hybridation *in situ* en sonde froide n'est pas une technique quantitative. De plus, elle ne permet pas d'évaluer des différences faibles ou moyennes de marquages. Ce gène est également exprimé au stade embryonnaire de 15 jours au niveau des zones périventriculaires. A partir du stade embryonnaire de 10 jours, les cellules de la partie moyenne de la rétine sont marquées par la sonde anti-sens spécifique de **CAS6**. Un marquage est également observé au niveau du plexus choroïde.

Mis à part le plexus choroïde dont les cellules sont définies comme intervenant dans la production de molécules du liquide céphalo-rachidien, certaines zones où est exprimé **CAS6** correspondent à la localisation de cellules souches reconnues. En effet dans la région antérieure du ventricule correspondant au bulbe olfactif, on peut

observer pendant la période pré et postnatale, la production et la migration de cellules souches ainsi que de précurseurs neuronaux (Bonfanti *et al.*, 1997. Tarozzo *et al.*, 1998). Ce phénomène a été également observé chez les oiseaux.

* Le gène CAS6 pourrait donc être considéré comme un marqueur des cellules souches du fait de son motif d'expression spécifique. Cependant, nous n'avons pour le moment d'autres arguments que leur localisation pour émettre l'hypothèse selon laquelle les cellules marquées seraient des cellules souches. En effet aucun marqueur exclusif de ces cellules n'est aujourd'hui connu en particulier chez les oiseaux. Il serait donc intéressant de savoir si les cellules exprimant le gène Cas6 dans l'épithélium olfactif expriment également la kératine. En effet, une telle expérience permettraient d'identifier les cellules exprimant ce gène et donc de confirmer ou d'infirmer son action au niveau des cellules souches.

* Lors des analyses bioinformatiques aucune similitude notable avec des gènes répertoriés dans des banques de données n'a été observée. La fonction du gène correspondant à CAS6 reste donc encore inconnue. Ainsi la fin du séquençage de clones phagiques positifs et la surexpression de ce gène au sein de l'épithélium olfactif pourra peut être nous éclairer sur une éventuelle fonction de ce gène.

Le gène correspondant à la séquence HYP A6, pourrait être exprimé de manière accrue au niveau de la partie médiane de l'épithélium olfactif et du côté où le nerf a été lésé. Cependant cette augmentation est peu sensible dans la mesure où un motif d'expression est aussi observé au niveau de l'épithélium d'un embryon normal et que la technique d'hybridation *in situ* ne permet pas de détecter des variations subtiles dans les niveaux d'expression. La partie médiane de l'épithélium est le site de localisation des neurones immatures. Il semblerait donc que le gène correspondant à la séquence HYP A6 soit exprimé préférentiellement dans l'épithélium olfactif au niveau de neurones immatures.

* A partir du stade embryonnaire de 10 jours, on observe un marquage à la périphérie du canal de l'épendyme. Or, il a été montré que des cellules bordant le canal seraient des cellules souches ayant une capacité d'auto-renouvellement et une division asymétrique (Johansson *et al.*, 1999). Les cellules précurseurs qui en sont issues se déplacent de manière radiaire par rapport au canal au cours de leur maturation. Le marquage observé à partir d'HYP A6 est localisé à la proche périphérie du canal de l'épendyme zone au niveau de laquelle ont été décrits ces précurseurs immatures.

A partir de 13 jours, les cellules marquées sont non seulement localisées à la périphérie du canal, mais également dispersées entre celui-ci et les cornes antérieures de la moelle épinière. Nous pouvons donc penser que les précurseurs et les neuroblastes expriment HYP A6 alors qu'ils migrent à travers la moelle épinière au cours de leur différenciation. En effet, on peut considérer qu'à ce stade les neurones marqués sont encore tous immatures.

* Un marquage similaire est observé au niveau de la rétine où là encore aux stades embryonnaires de 13 et 15 jours des neurones sont considérés comme post-mitotiques mais peu matures. La sous-population de cellules marquées reste à caractériser.

* Cependant, nous avons observé une exception, le gène HYP A6 est exprimé au niveau des neurones plus différenciés de l'hyperstriatum à un stade embryonnaire de 16 jours. A ce stade, les neurones marqués présentant un noyau relativement gros, rond et régulier. Ce motif d'expression est observé à partir de 13 jours.

Selon ces deux constatations, il est possible de penser qu'HYP A6 aurait deux modes d'expression correspondant à deux fonctions différentes. L'une serait indispensable au niveau de neurones immatures et l'autre nécessaire aux neurones matures.

Les analyses bioinformatiques, visant à comparer la séquence isolée avec celles de gènes répertoriés dans des banques de données, indiquent une similitude d'environ 80%

entre les séquences nucléiques d'HYP A6 et celle de la sous-unité α du canal calcique de type T. Ce canal cloné pour la première fois dans les années 90 (Perez-Reyes *et al.*, 1998) est activable à de faibles potentiels. Il intervient dans l'activité pace-maker et permet l'entrée d'une petite quantité d'ion calcium durant une courte période. Ce canal est composé d'au moins 4 sous-unités. La sous-unité α permet le passage des ions calcium. Elle détermine le voltage critique pour l'entrée des ions et la sensibilité du canal à certains produits pharmacologiques. Les sous-unités $\alpha_2\delta$, β et γ sont des sous-unités complémentaires nécessaires à la formation d'un canal fonctionnel. Chez le rat, il semblerait que ce gène soit exprimé préférentiellement au niveau du système nerveux central. Cependant ce canal interviendrait également dans l'activité pace-maker cardiaque (Cribbs *et al.*, 1998).

La similitude entre le gène de ce canal spécifique et la séquences HYP A6 nous a permis d'émettre deux hypothèses. On peut, en effet, envisager une double fonction de la protéine codée par ce gène et ceci du fait de son expression dans deux types cellulaires différents.

* Premièrement, dans les neurones matures de l'hyperstriatum le gène correspondant à HYP A6 pourrait intervenir dans la transmission de l'influx nerveux. A ce niveau, les gènes codant les sous-unités nécessaires à la formation d'un canal fonctionnel devraient être exprimés.

* Deuxièmement, nous avons pu observer que l'expression d'HYP A6 cesse après la maturation des neurones olfactifs. Il semblerait donc qu'au niveau des neurones immatures y compris ceux de l'épithélium olfactif le gène correspondant à HYP A6 ne code pas une protéine intervenant dans la transmission du signal. Il a été établi qu'une entrée d'ion calcium pouvait être impliquée dans la différenciation neuronale (Moreau *et al.*, 1994). Ces ions pourraient intervenir par exemple dans une voie de transduction intervenant dans l'activation des facteurs de transcription et aboutissant à la synthèse de protéines neuronales spécifiques. Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle ce gène est exprimé au niveau de neurones immatures.

Dans ce cas, nous pouvons nous demander si les sous unités normalement associées à la sous unité α sont présentes dans ces neurones immatures. Différentes hypothèses peuvent alors être émises. Tout d'abord, toutes les sous unités normalement associées sont synthétisées, des conditions spécifiques confèreraient un nouveau rôle à l'influx calcique. D'autre part, seule la sous unité α pourrait être présente, elle interviendrait comme un simple pore ionique. Enfin, nous pouvons envisager que cette sous unité soit tronquée ou modifiée mais là encore la présence ou non des sous-unités $\alpha_2\delta$, β et γ peut être envisagée.

Il s'agit pour le moment d'hypothèses basées uniquement sur des similarités de séquences entre le fragment HYPA6 de 921 pb de poulet et l'ADNc de 5000 pb de la sous unité α du canal calcique de type T de rat. Le clonage et le séquençage du gène entier devraient permettre de confirmer ou non ces similarités. Une étude de sa fonction à l'aide d'antisens est également prévue. Ceci pourra être réalisé grâce à la technique d'électroporation *in ovo* récemment introduite au laboratoire.

Le gène correspondant à la séquence LR13 est exprimé dans la partie la plus basale de l'épithélium olfactif, c'est-à-dire au niveau de la zone où siègent les cellules souches olfactives présumées. Nous ne pouvons pas affirmer ou confirmer du fait des limites de la technique d'hybridation *in situ* que ce gène est surexprimé après la section du nerf. Le gène LR13 semble également exprimé dans d'autres zones où sont localisées des cellules souches neurales à savoir au niveau des cellules péri-ventriculaires et des cellules bordant le canal de l'épendyme.

- Ainsi, tout comme le gène Cas6 du fait de son motif d'expression particulier, il semblerait que le gène correspondant au fragment LR13 soit un gène spécifiquement transcrit au niveau des cellules souches neurales.

- Les analyses bioinformatiques effectuées sur ce fragment de 973 pb montre qu'il possède une homologie de 68 % avec le gène NFIA précédemment clonée chez le poulet (Rupp *et al.*, 1990). Les protéines NFIs sont comprises dans une famille

spécifique de protéines se liant à l'ADN. Il s'agit de facteurs de transcription capable de se fixer au niveau d'une séquence palindromique spécifique : TGGC/A(N)₅GCCA. Des sites spécifiques de liaison pour cette protéine ont été trouvés en amont de gènes qui s'expriment spécifiquement dans le cerveau (Bedford et al., 1998), dans la rétine (Ben-Or et Okret, 1993) et dans l'épithélium olfactif (Baumeister et al., 1990). Ces protéines interviennent donc dans la régulation de la transcription des gènes. Il existe au total quatre gènes différents codant pour ce type de protéines, appelés NFI-A, NFI-B, NFI-C et NFI-X, ce qui laisse supposer qu'il doit exister une grande variété de protéines NFIs. La diversité de ces protéines est augmentée par les nombreux épissages alternatifs des transcrits primaires correspondants à ces gènes (Rupp et al., 1990). La zone d'homologie entre LR13 et NFI se situe dans la partie carboxy terminale de la protéine, comportant un domaine de modulation de la transcription. La séquence de ce domaine varie énormément entre les différentes protéines produites à partir de l'épissage alternatif d'un même transcrit primaire. Nous pouvions donc penser que la protéine LR13 était issue d'un épissage alternatif du gène NFI-A puisque le fragment LR13 a été isolé à partir d'ARNm. Cependant le pattern de ce gène, ne correspond pas à celui obtenu par NFI-A au niveau de l'épithélium olfactif. En effet, au sein du système olfactif périphérique, le gène NFI-A est exprimé dans la partie médiane chez l'embryon de souris au stade E17,5 (Behrens et al., 2000). Mais aucun marquage par hybridation *in situ* n'est observé au sein de la partie basale de l'épithélium. Le gène correspondant au fragment LR13 est donc un gène différent du gène NFI-A. Il pourrait s'agir d'un gène de la même famille que les gènes codant les protéines NFIs. Cependant, du fait de l'homologie de séquences observée concernant le domaine modulateur de la transcription, on peut émettre l'hypothèse selon laquelle la protéine codée par LR13 est une protéine possédant un domaine modulateur de la transcription. Il pourrait donc s'agir d'un facteur de transcription, de la même famille ou d'une famille différente de celle des protéines NFIs nécessaire à la prolifération ou à la survie des cellules souches

olfactives et des autres cellules souches neurales. Dans tous les cas, nous pouvons dire, que nous sommes donc en présence d'un gène marqueur des cellules souches neurales.

En conclusion, cette étude a permis d'isoler des séquences correspondant à deux types de gènes qui semblent intervenir dans la neurogenèse olfactive. L'un au niveau de neuroblastes et de neurones immatures, les deux autres ayant des motifs d'expression pouvant coïncider avec des cellules souches ou des précurseurs neuronaux. Pour l'ensemble de ces gènes, après avoir vérifié qu'ils étaient exprimés au niveau de l'épithélium olfactif, l'étude de leur expression spatio-temporelle a été réalisée de manière à nous éclairer sur leur fonction. Cependant, devant les difficultés de séquençage que nous avons rencontré, l'identité exacte des gènes et la fonction des protéines correspondantes reste inconnue. Il semble donc important de poursuivre cette étude de manière à déterminer la séquence exacte et complète des gènes correspondant à ces fragments de manière à confirmer ou à infirmer les hypothèses déjà émises et déboucher sur une étude de la fonction de leur produit. Une telle étude pourra alors être réalisée par surexpression du gène ou par un blocage d'expression à l'aide d'antisens. Ceci pourra être réalisé grâce à la technique d'électroporation *in ovo*. Finalement, nous avons ouvert des pistes qui avec la caractérisation de séquences de gènes exprimés au cours de la neurogenèse nous permettront de progresser dans cette direction.

IX-2: Greffes des cellules souches purifiées par FFF et conditionnées *in vitro*.

IX-2-1 : Introduction

Les cellules souches sont caractérisées par leur caractère indifférencié, leur pluripotentialité, leur capacité d'auto renouvellement et leur aptitude à réparer des

tissus lésés. En tenant compte de cette dernière caractéristique, nous avons voulu étudier au cours de ces travaux, la capacité des cellules triées par FFF à s'implanter, migrer et se différencier dans un environnement étranger. En effet, de nombreuses études ont montré que des neurosphères greffées au sein du système nerveux central étaient capables de survivre, de migrer puis de se différencier pour produire de nouveaux neurones notamment au niveau de l'hippocampe (Gage et al., 1995), des ventricules (Yandava et al., 1999), des zones périventriculaires (Fricker et al., 1999) et du bulbe olfactif (Suhonen et al., 1996).

IX-2-2 : Démarche expérimentale

De manière à savoir si les cellules souches olfactives isolées par FFF étaient capables de survivre, migrer, et se différencier dans un environnement étranger, nous avons greffé ces cellules dans un tissu autre que le système olfactif périphérique. Pour cela, nous nous sommes heurtés à plusieurs problèmes : comment différencier les cellules greffées des cellules environnantes ? Et où greffer ces cellules souches présumées ?

De façon à pouvoir différencier les cellules greffées des cellules environnantes, nous avons choisi d'utiliser la technique du marquage caille/poulet (Le Douarin, 1973). En effet, la chromatine des cellules de caille est beaucoup plus condensée que celle des cellules de poulet. Cette particularité permet donc, soit par coloration de Feulgen et Rossenbeck soit par un marquage immunohistochimique en utilisant un anticorps anti-QCPN spécifique de la chromatine des cellules de caille, de suivre le devenir de ces cellules dans un environnement poulet hôte. Cette démarche présente de nombreux avantages. En effet, elle nous permet de greffer des cellules n'ayant subi aucune modification, contrairement à la démarche habituelle qui consiste à transférer dans les cellules à greffer un gène rapporteur qu'il soit fluorescent ou non. D'autre part, elle permet de greffer des cellules d'oiseau chez un autre oiseau et chez un embryon évitant ainsi au maximum les rejets des greffons. Ainsi, cette

expérimentation permet de rester le plus proche possible des processus physiologiques normaux.

Enfin, nous avons choisi, pour débiter cette étude de greffer ces cellules au niveau du télencéphale d'un embryon de poulet au 3^{ème} jour de vie embryonnaire. Plusieurs arguments ont déterminé ce choix. D'une part, l'environnement de l'embryon à ce stade est relativement riche en facteurs de croissance ce qui permet d'augmenter les chances de survie des cellules greffées. D'autre part, en injectant les cellules dans le tube neural au niveau du télencéphale, les cellules souches olfactives de caille vont se trouver au contact du neuroépithélium bordant les parois du tube neural. L'épithélium olfactif étant considéré comme un neuroépithélium, le nouvel environnement des cellules greffées possèdera des similarités avec leur environnement d'origine.

Ainsi, des cellules souches olfactives de caille, au préalable triées par FFF, ont été injectées au niveau du télencéphale d'un embryon de poulet au stade E3.

IX-2-3 : Résultats préliminaires des greffes au niveau du télencéphale d'un embryon de poulet E3 de cellules souches neurales olfactives de caille triées par FFF.

IX-2-3-1 : Injection des cellules triées

Durant, cette expérimentation, deux éléments doivent retenir l'attention. Le premier consiste à injecter la suspension cellulaire de telle manière que la totalité des cellules demeurent à l'intérieur du tube neural. D'autre part, la formation de bulles lors de l'injection est à éviter puisqu'il s'agit d'un facteur de mortalité relativement important.

Les résultats concernant le rendement des injections sont reportés dans le tableau suivant :

Temps de prélèvement après l'injection (Heures)	12	24	48	72
Nombre d'embryons opérés	12	13	12	10
Nombre d'embryons survivants	11	10	9	6

Le rendement de cette manipulation est relativement élevé puisqu'il est de l'ordre de 76% de survie.

IX-2-3-2 : Greffes

Nous avons choisi, au départ, de suivre le devenir des cellules greffées selon des temps précis à savoir 16h, 24h, 48h et 72h après la greffe. 12 heures après leur injection les cellules greffées sont détectées au niveau du télencéphale dans le tube neural au contact du neuroépithélium. De nombreux débris cellulaires sont associés à ces

cellules, ce qui laisse supposer qu'il doit y avoir durant l'injection un fort taux de mortalité cellulaire (Figure8).

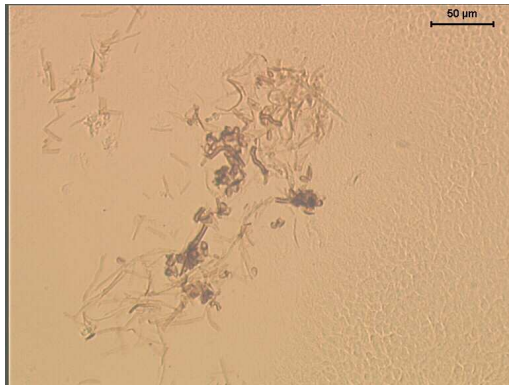


Figure8: cellules greffées de caille
16h après l'injection

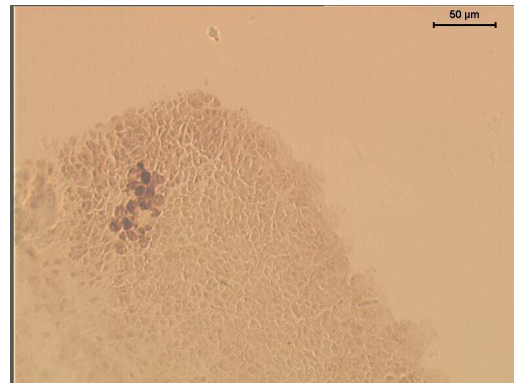


Figure9: cellules de caille greffées
24 h après l'injection.

48 heures après la greffe, les cellules souches de caille ont pénétré le neuroépithélium et ont commencé à se mêler aux cellules de l'hôte(Figure9). Cette pénétration se poursuit 48 heures après l'injection (Figure10). A ce stade la morphologie des cellules commence à évoluer en effet, les cellules s'allongent. Puis 72 heures après la greffe, les cellules de caille apparaissent sous la forme de petits amas de cellules disséminées dans la totalité de l'hyperstriatum du poulet (Figure11).



Figure10: cellules de caille greffées 48h
après l'injection



Figure11: cellules de caille greffées 72h
après l'injection au niveau de
l'hyperstriatum

IX-2-4 Discussions et perspectives

Au cours de cette étude préliminaire, nous avons montré que des cellules de caille préalablement triées par FFF avaient la capacité de survivre et de migrer dans un environnement autre que celui dont elles sont originaires. Ces résultats basés sur l'injection de cellules au niveau du télencéphale d'un embryon de poulet au stade E3 semblent donc être en accord avec l'hypothèse selon laquelle les cellules triées par FFF et présentant les caractéristiques des cellules basales horizontales (expression de la kératine et du TrkA) sont bien les cellules souches du système olfactif. En effet, ces cellules sont capables d'autorenouvellement, ont un caractère pluripotentiel et indifférencié et peuvent également survivre dans un environnement étranger, s'y multiplier et migrer.

De plus le fort taux de survie observé après l'injection semble indiquer que ce type de manipulation n'est pas trop stressant pour les embryons greffés. D'autre part le fort taux de mortalité présumé, 16 heures après l'injection des greffons pourrait être dû au mode d'injection. En effet, la pipette étirée à la flamme qui nous sert d'injecteur est relativement fine, il faut donc injecter une suspension au niveau de laquelle les cellules sont relativement bien dissociées, et peu concentrées de manière à injecter les cellules pratiquement une à une.

En résumé, les cellules de caille injectées dans le tube neural d'un embryon de poulet au stade E3 adhèrent au neuroépithélium dans les 16h qui suivent l'injection. Puis elles pénètrent progressivement le neuroépithélium et semblent coloniser par la suite l'ensemble du télencéphale du poulet. Dans un même temps, ces cellules semblent

changer de morphologie ce qui peut laisser supposer qu'elles commencent à se différencier.

Des travaux supplémentaires devront être effectués de manière à approfondir ces résultats. Ainsi, par des techniques utilisant des marqueurs spécifiques des neurones, nous tenterons de déterminer si ces cellules se différencient en neurones. Si cela est le cas il serait intéressant de savoir si les neurones formés à partir de ces cellules gardent leurs caractéristiques olfactives ou adoptent les caractéristiques des neurones localisés dans la zone où elles se sont implantées.

Il est également envisagé d'effectuer une démarche expérimentale similaire en greffant ces cellules chez des poulets adultes dans une zone déterminée par stéréotaxie. Enfin une fois que tous ces éléments seront connus, nous pourrons envisager une application thérapeutique de ces résultats. En effet, des auto-greffes thérapeutiques au niveau du système nerveux central pourraient être effectuées à partir d'un fragment d'épithélium prélevé sur un patient atteint par exemple de maladies neurodégénératives ou de pathologies nerveuses accidentelles. Ce type de greffe offre un grand avantage puisqu'il réduit le risque de rejet du greffon car il s'agirait ici d'autogreffes.

La mise au point du conditionnement des cellules souches neurales ainsi triées devra être réalisée soit *in vitro* soit en même temps que la greffe. Il s'agira notamment de déterminer si les cellules greffées seront des cellules en suspension juste après le tri FFF, des épithélium cuboïdaux (pseudoplacodaux) ou des neurosphères obtenues *in vitro*. De plus une étude des facteurs de croissance permettant de stimuler la multiplication des cellules souches devant être greffées, ainsi que leur différenciation en neurones spécifiques de la zone lésée et devant être réparée. Il a ainsi été démontré précédemment que le NGF stimulait la différenciation de neurones dopaminergiques à partir de cellules greffées dans le putamen et le noyau caudé de Parkinsoniens (Olson et al., 1989)

Discussion générale

L'épithélium olfactif possède une caractéristique particulière et intéressante puisque les neurones qui le constituent se renouvellent tout au long de la vie de l'individu. Cette capacité à remplacer, chez l'adulte, les neurones qui meurent en fait un excellent modèle pour l'étude de la neurogenèse. En effet, sa facilité d'accès permet d'étudier les processus de renouvellement *in vivo* dans des conditions physiologiques normales ou expérimentales. De plus, comme tous les autres tissus doués de régénérescence tels que le foie, la peau ou bien encore le sang, il a été envisagé que cette capacité de renouvellement est basée sur la présence au sein de l'épithélium de cellules souches neurales.

Les facteurs de croissances et notamment les neurotrophines comme le NGF, le BDNF semblent impliqués dans la régulation de la neurogenèse au niveau du système nerveux central ainsi qu'au niveau du système olfactif. Ainsi l'étude de la neurogenèse olfactive peut fournir des indications permettant de mieux comprendre la néo-neurogenèse dont l'existence a été révélée récemment dans certaines structures du système nerveux central.

Peu d'éléments sont connus concernant les mécanismes de la mort neuronale au sein du système olfactif. Il a cependant été clairement montré qu'une interaction relativement étroite existait entre la mort neuronale et la régénérescence et ceci de manière à maintenir une quantité constante de neurones fonctionnels au sein du système olfactif périphérique.

Ainsi, la fonctionnalité du système olfactif est régie par un ensemble de processus complexes et relativement liés. La plupart des données concernant ces processus, sont le résultat d'études portant sur les mammifères. Relativement peu d'éléments étaient connus dans ce domaine concernant le système olfactif aviaire. Pourtant le poulet constitue un modèle de choix pour l'étude expérimentale de l'ensemble de ces phénomènes. En effet, la longueur et la localisation relativement superficielle du nerf olfactif chez les oiseaux facilite, leur tolérance à la section du

nerf et font des poussins mais aussi des embryons un matériel d'étude idéal. En effet, l'accès aisé aux embryons permet une étude comparée de la neurogenèse au cours du développement et de la néo-neurogenèse durant la vie adulte. Ainsi, nous avons pu obtenir grâce à cette étude de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre les phénomènes régissant la neurogenèse olfactive et donc l'interaction vie/ mort neuronale ainsi que de caractériser et de mieux maîtriser les cellules souches neurales qui sont à la base de cette néo-neurogenèse.

I-Dégénérescence neuronale

I-1 : Conséquences de l'axotomie après la naissance :

Nos résultats confirment les données de la littérature concernant les mammifères. En effet, la section du nerf olfactif chez des poussins provoque une apoptose massive des neurones olfactifs (Graziadei et Monti-Graziadei, 1979. Jennings et al., 1995 ; Carr et Farbman, 1993 ; Calof et al., 1996). Cette apoptose provoquée par la section du nerf touche les neurones matures aussi bien que les neurones immatures. Cependant, elle épargne les cellules situées dans la partie basale de l'épithélium ainsi que les cellules de soutien (Carr et Farbman, 1993 ; Calof et al., 1996).

Chez des poussins opérés au deuxième jour de la vie embryonnaire, la section du nerf provoque une stimulation de la mort neuronale par apoptose dès la 12^{ème} heure post-opératoire, le maximum étant atteint 24 heures après l'axotomie. Selon les données concernant les animaux adultes, le délai de réponse à la lésion est dans ce cas diminué. Ce laps de temps plus court correspond à la durée nécessaire au transport rétrograde dans les axones neurosensoriels de facteurs de croissance produits dans le bulbe et il a été montré qu'elle est inférieure à 24 heures pour le NGF chez le nouveau né (Miwa et al., 1998b). La survie des neurones, ainsi que leur capacité à être renouvelés pourrait donc être sous la dépendance de facteurs de croissance produits par le bulbe olfactif ou les cellules engainantes enveloppant le nerf olfactif.

I-2 : conséquence de l'axotomie chez l'embryon :

Contrairement à nos attentes et malgré les différentes techniques utilisées, l'apoptose est peu décelée dans l'épithélium olfactif après la section du nerf chez l'embryon de poulet de E17 (Mathonnet et al., 2002). Ainsi, les épithéliums pré et post-nataux semblent répondre différemment à l'axotomie.

Après la lésion axonale, l'épithélium olfactif de l'embryon s'amincit dès la troisième heure post-opératoire, alors qu'il n'existe que quelques cellules en apoptose (moins de 6%) localisées principalement près de la bordure épithéliales et quelques unes ont pu être détectées dans la lumière de la cavité nasale. La totalité de l'épaisseur de l'épithélium est reconstituée 48 heures après la section du nerf (Mathonnet et al., 2002).

Deux hypothèses expliquant cette réponse à l'axotomie chez l'embryon peuvent alors être émises : **1** : La vague apoptotique pourrait survenir très précocement avant la troisième heure post-opératoire, et les neurones apoptotiques être expulsés dans la lumière nasale. **2** : certains neurones dont les axones ont été sectionnés pourraient également perdre leur état de différenciation (plus ou moins complète) sans pour autant entrer en apoptose, la diminution du nombre de cellules possédant des marqueurs de différenciation (COR, CamKII) étant beaucoup plus importante que l'augmentation très limitée du nombre de cellules en apoptose.

L'élimination par expulsion de l'épithélium olfactif des cellules apoptotiques avait déjà été envisagée lors du renouvellement physiologique de l'épithélium olfactif où les cellules en dégénérescence se déplaçaient vers la lumière de la cavité nasale (Farbmann, 1990). De plus l'axotomie est responsable chez les mammifères adultes d'une expression transitoire de la protéine p75 (récepteur des neurotrophines) marquant des cellules en apoptose situées dans la cavité nasale. L'expulsion cellulaire semble être le mode d'élimination prédominant chez l'embryon et pourrait expliquer l'amincissement de

l'épithélium alors que l'on n'y détecte qu'un faible pourcentage de corps apoptotiques . Cette différence pourrait indiquer une modification des interactions entre les cellules de la lignée neuronale et les cellules de soutien au cours de la maturation prénatale de l'épithélium olfactif. Il est aussi à noter que la formation des glandes responsables de la production du mucus qui recouvre la partie apicale de l'épithélium ne commence que vers E15-16. La production de mucus n'étant complète qu'en fin d'incubation, le contenu liquide de la cavité nasale est éliminé et remplacé par l'air ambiant du fait de la rupture de la coquille (E19-E20)..

La dédifférenciation cellulaire a été prouvée *in vitro* pour d'autres types cellulaires. En effet, des cellules de Schwann privées d'IGF perdent leur capacité de myélinisation et retrouvent des caractères de cellules immatures indifférenciées (Russel et al., 2000). L'épithélium olfactif est un des tissus nerveux les plus riches en facteurs de croissance et les neurones de l'épithélium olfactif post-natal apparaissent très sensibles aux facteurs sécrétés par le bulbe contrairement aux neurones olfactifs embryonnaires qui semblent plus sensibles aux facteurs locaux. En effet, ces neurones n'ont pas tous établi les connexions bulbaires fonctionnelles complètes. Ainsi, l'axotomie pourrait provoquer une dédifférenciation de ces neurones embryonnaires qui perdraient certains de leurs marqueurs tel que la CamKII ou les COR, mais trouveraient dans leur environnement proche tous les facteurs nécessaires à leur survie.

L'évolution ultérieure de ces neurones dédifférenciés reste à définir. Ceux-ci pourrait se différencier à nouveaux et régénérer leur axones ou retourner à l'état de cellules basales globulaires et retrouver leur potentiel mitotique. Cette dernière hypothèse pourrait être corroborée par les résultats obtenus *in vitro* et discutés ci après.

II- Régénération neuronale

II-1 Conséquence de l'axotomie chez l'embryon et l'adulte :

Aux stades pré et post-natal, l'axotomie a été responsable d'une élévation de l'index mitotique telle que nous l'avons démontrée après incorporation de BrdU. Cette élévation, modérée chez l'embryon, semble plus rapide chez le poussin. En effet, 48 heures après la lésion, l'index mitotique est multiplié par 2,5 et revient à son taux basal au 5^{ème} jour post-opératoire (Mathonnet et al., 2002). Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature (Graziadei et Monti-Graziadei 1979, Guillemot et al., 1993). Chez le pigeon, l'axotomie provoque une prolifération des cellules globulaires et l'intégrité fonctionnelle de l'épithélium est retrouvée 30 jours après l'opération (Graziadei et al., 1979). Chez le rongeur, la bulbectomie entraîne également un accroissement de la division cellulaire (Calof et al., 1996 ; Carr et Farbman, 1993). Toutefois, il semblerait que ces processus soient plus rapide aux stades périnataux. Ces résultats semblent donc aller dans le sens des résultats des études concernant l'évolution de la plasticité des neurones olfactifs au cours du vieillissement. Ainsi les neurones olfactifs des sujets âgés ou souffrant de la maladie d'Alzheimer ont une capacité de régénération réduite (Loo et al., 1996).

II-2- Marqueurs des différents types cellulaires olfactifs

Le suivi de la régénération neuronale nécessite l'utilisation de marqueurs des divers types cellulaires en particulier de la lignée neuronale.

II-2-1 Marqueurs isolés par DDRT.

Lors de l'étude de l'expression différentielle des gènes exprimés après axotomie d'un embryon au stade E16, différents fragments de gènes ont pu être isolés. Les trois fragments étudiés lors de ces travaux apparaissent impliqués dans la régénération neuronale à différents niveaux selon les cellules dans lesquelles ils sont exprimés. Considérant l'ensemble des résultats précédemment exposés et les hypothèses émises, selon lesquelles, après axotomie, le processus d'apoptose est très précoce et rapide ou que les cellules lésées seraient capable de se différencier chez l'embryon, il est possible d'expliquer que les fragments des gènes isolés par DDRT sont en grande majorité impliqués dans les phénomènes de régénération neuronale.

Sur les trois fragments étudiés, deux sont exprimés au niveau des cellules situées dans la partie basale de l'épithélium. De plus, l'étude de l'expression de ces gènes, étendue à l'ensemble du système nerveux central, a montré qu'ils étaient exprimés dans des zones où sont généralement localisées des cellules souches neurales à savoir les zones périventriculaires, mais également, la zone périépendymaire de la moelle épinière. Cependant du fait de l'absence d'homologie concernant le fragment du gène Cas6 avec l'ensemble des gènes répertoriés dans les banque de données, aucune hypothèse concernant la fonction de ce gène ne peut être émise. Toutefois l'expression de ce gène constituerait un marquage des cellules souches neurales olfactives et centrales.

Concernant le gène LR13, l'homologie de ce fragment avec la partie 3' du gène NFI-A d'une famille de gènes codant des facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression de gènes, nous a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle

ce gène pourrait aussi coder un facteur de transcription. Il est toutefois intéressant de noter que le motif d'expression de ce gène ne correspond pas à celui du gène NFI-A cloné chez la souris (Behrens et al., 2000). Ainsi, le gène LR13 pourrait intervenir dans la régulation de gènes indispensables à la survie, la prolifération ou l'activation des cellules souches.

Le gène correspondant au fragment HypA6 semble exprimé à la fois au niveau des neurones matures de l'hyperstriatum et de neurones immatures situés au sein de l'épithélium olfactif. Selon les cas, sa fonction pourraient être différente. En effet, d'après les fortes homologues entre ce fragment et le gène codant la sous unité α du canal calcique de type T cloné chez le rat (Perez-Reyes et al., 1998) ainsi que les zones où ce gène est exprimé, deux hypothèses ont pu être émises.

Quand HypA6 est exprimé au niveau des neurones matures de l'hyperstriatum tout à fait fonctionnels, la présence de cette sous unité pourrait intervenir dans la transmission du signal nerveux. Des études utilisant le blocage spécifique des canaux de type T, pourraient nous apporter des éléments quant à la fonction précise de ce gène.

Quand le gène HypA6 est exprimé au niveau de neurones immatures de l'épithélium olfactif, l'entrée d'ions calciques via la protéine codée par ce gène pourrait intervenir dans la différenciation neuronale. Il a en effet été montré qu'une entrée d'ion calcium pouvait être impliquée dans la différenciation neuronale (Moreau et al., 1994). L'augmentation de calcium intracellulaire pourrait intervenir par exemple dans une voie de transduction intervenant dans l'activation des facteurs de transcription et aboutissant à la synthèse de protéines neuronales spécifiques. Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle ce gène est exprimé au niveau de neurones immatures.

Ce travail bien qu'encore inachevé en ce qui concerne le séquençage complet des gènes, a toutefois permis de disposer de sondes fournissant des possibilités de

marquages spécifiques de cellules souches et de précurseurs neuronaux de l'épithélium olfactif, mais aussi applicables au système nerveux central.

II-2-2 - La kératine : marqueur des cellules basales horizontales et des cellules de soutien :

Il est maintenant clairement établi que chez les rongeurs, les cellules de soutien et les cellules basales horizontales expriment la kératine (Suzuki et Takeda, 1991 ; Schwob et al., 1994). Ces données sont similaires aux résultats obtenus chez le poulet, il semblerait en effet qu'aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ces deux types cellulaires expriment la kératine (Comte et al., 2003). Au cours du développement du poulet, les modifications des motifs d'expression de cette protéine dans le système olfactif apparaissent en relation avec les grandes étapes de la neurogenèse olfactive. Ainsi, jusqu'au 5^{ème} jour de la vie embryonnaire, l'ensemble des cellules de l'épithélium olfactif expriment très fortement la kératine, tout comme l'épithélium respiratoire. Puis entre E5 et E8, seuls les précurseurs des cellules de soutien expriment cette protéine qui intervient dans la formation du cytosquelette de la plupart des cellules épithéliales. On peut donc penser que l'expression de la kératine marque la première étape de la différenciation de l'épithélium et intervient également dans la mise en place de sa cohésion et de sa structure. Enfin, à partir de E8, à la fois les cellules horizontales et les cellules de soutien expriment la kératine. Ces résultats sont confirmés par les études antérieures réalisées chez le rat (Suzuki et Takeda, 1991). Ce changement d'expression correspond au début de la synaptogénèse des premières fibres axonales sensorielles avec les cellules bulbaires. De plus, nous avons montré que la quantité de cellules basales exprimant la kératine augmente durant les grandes étapes de la neurogenèse. Ainsi, dans la partie médiane de l'épithélium où le nombre de neurones devient relativement élevé, le nombre de cellules horizontales est également

relativement plus important que dans les zones où le nombre de neurones est moindre. L'ensemble de ces résultats nous permet donc d'émettre l'hypothèse suivante :

Les cellules basales horizontales interviendraient dans la neurogenèse olfactive aviaire. Ces résultats vont dans le sens de travaux réalisés chez la souris. En effet, après bulbectomie, aucun changement du nombre de HBCs n'avait été observé (Schwartz-Levey et al., 1991). Mais après lésion à l'aide de bromure de méthyle, lorsqu'une grande partie des cellules basales globulaires sont éliminés, la prolifération d'HBCs localisées dans certaines zones de l'épithélium est suractivée (Schwob et al., 1995). Il apparaît donc qu'il existe un lien entre les cellules basales horizontales et la neurogenèse quelle que soit l'espèce étudiée. Ces observations peuvent être associées aux phénomènes observés dans le foie où il doit y avoir destruction d'une grande partie des précurseurs immédiats avant que la division des cellules souches ne soit activée.

II-3 Les cellules basales horizontales : cellules souches présumées de l'épithélium olfactif aviaire.

Dans le but de l'infirmier ou de la confirmer l'hypothèse émise précédemment, les cellules basales horizontales ont été isolées. *In vitro* ces cellules se comportent différemment selon la concentration à laquelle elles sontensemencées. A de faibles concentrations, ces cellules acquièrent des caractéristiques morphologiques identiques aux cellules trouvées au niveau de la placode olfactive. De plus, aucun marqueur spécifique (Kératine, COR, CamKII, TrKA) ne semble exprimé par ces cellules. Cependant lorsque les HBCs sontensemencées à de fortes concentrations, elles forment rapidement des neurosphères spécifiques de la présence de cellules souches. A partir de ces structures particulières, tous les types cellulaires qui coexistent au sein de l'épithélium sont produits, à savoir : les cellules de soutien, les cellules basales

globulaires et les neurones olfactifs. L'ensemble de ces observations suggèrent que les cellules basales horizontales *in vitro* sont capables de produire l'ensemble des cellules constituant l'épithélium olfactif. Des résultats similaires avaient été obtenus précédemment lors d'étude *in vitro* de cellules basales horizontales de rat. Il avait été montré que les HBCs pouvaient produire des GBCs et qu'une lignée cellulaire établie à partir de cellules ayant toutes les caractéristiques des HBCs était capable de générer des nouveaux neurones (Sato et Takeuchi, 1995). D'autre part nous avons montré que ces cellules isolées possédaient des caractères indifférenciés, multipotentiels et étaient douées d'autorenouvellement. L'ensemble de ces données nous a amené à émettre l'hypothèse suivante :

Les cellules basales horizontales seraient les cellules souches neurales du système olfactif. Il s'agirait de cellules souches qui nécessitent pour être activées la perte d'une majorité de précurseurs (GBCs). Ceci pourrait expliquer le faible taux de prolifération observé pour ces cellules chez le rat (Holbrook et al., 1995 ; Huard et Schwob, 1995) et conforterait l'hypothèse émise par Susuki et Susuki (1998) suggérant qu'une mort des cellules neuronales ou des GBCs durant le développement aboutirait à la formation d'un épithélium ne comprenant au départ que des HBCs et des cellules de soutien. Enfin l'hypothèse selon laquelle les HBCs sont les cellules souches de l'épithélium olfactif est en accord avec les résultats de nos travaux montrant que les grandes étapes de la neurogenèse coïncident avec une production accrue de HBCs.

D'autre part nos résultats concernant la modification de l'évolution des cellules souches en culture *in vitro* selon leur concentration de départ suggèrent l'existence d'un facteur soluble permettant d'activer la prolifération des cellules basales horizontales. Ce facteur pourrait être sécrété par des HBCs activées de manière à stimuler la prolifération des HBCs encore quiescentes. Toutefois l'identité de ce facteur reste encore inconnu. Il semblerait qu'*in vitro* l'absence de ce facteur de croissance ne déclenche pas la mort de ces cellules mais plutôt leur dédifférenciation.

Enfin, les greffes de ce type de cellules au niveau du mésencéphale d'embryons de 3 jours, montre qu'elles sont capables de survivre, de proliférer et de s'implanter dans un environnement neuroépithélial différent de celui dont elles sont issues. En effet, l'épithélium olfactif est considéré comme un neuroépithélium issu de la plaque neurale tout comme le tissu bordant les parois des cavités cérébrales embryonnaires mais évoluent différemment dès les stades précoces de la morphogenèse du système nerveux.

II-4 Régulation de la neurogenèse olfactive aviaire

Dans l'épithélium embryonnaire, les cellules sensorielles sont en majorité des neurones en voie de différenciation dont certains n'ont pas encore établi de connexions avec le bulbe. Leur survie et leur différenciation finale doivent donc dépendre d'un grand nombre de facteurs de croissance. Au cours de ces travaux, nous avons étudié l'action de trois facteurs de croissances : L'IGF1, le NGF et le FGF2.

II-4-1 : L'IGF-1

Au cours de sa maturation l'épithélium olfactif devient plus sensible à la perte des facteurs de croissance produits par le bulbe. Cependant, l'axone même sectionné, garde sa capacité de transport rétrograde. C'est en se basant sur cette possibilité, que nous avons essayé de protéger les neurones axotomisés (Mathonnet et al., 2001). L'IGF-1 est un facteur anti-apoptotique, inhibant l'activation des caspases. Ainsi les neurones olfactifs qui expriment fortement l'IGF-1R résistent mieux à l'apoptose que ceux qui n'ont pas ou peu de récepteurs à l'IGF-1 (Van golden et al., 1998).

L'IGF-1R est exprimé dans les neurones olfactifs embryonnaires et adultes. Chez l'embryon de poulet, l'IGF-1R est présent même aux stades les plus précoces de l'embryogenèse c'est à dire dans la placode (Hozenberger et al., 1996). Les cellules mitrales bulbaires aviaires produisent de l'IGF-1 à partir de E9, précisément, au stade

où s'établissent les premières connexions bulbo-épithéliales. Cette production se poursuit après la naissance (Holzenberger et al., 2000). Lors de l'axotomie, l'application d'IGF-1 dans la solution de continuité axonale protège les neurones olfactifs de l'apoptose et active les cellules souches. En effet, un épaissement significatif de l'épithélium de rat nouveau-né est observé essentiellement au niveau de sa couche basale siège des cellules souches après application d'IGF-1 (Pixley et al., 1998).

Néanmoins, si l'effet anti-apoptotique d'IGF-1 persiste au delà de 72 heures, les effets d'activation des cellules souches et de préservation des neurones différenciés disparaissent 12 heures après la dernière infusion (Mathonnet et al., 2001). Cette observation renforce l'hypothèse d'une activation de la capacité mitotique des cellules basales par les cellules lésées et ce en rapport avec l'effet apoptotique.

II-4-2 : Le NGF

TrkA est le récepteur à haute affinité pour le NGF. Au niveau de l'épithélium d'un rat adulte, les seules cellules qui expriment ce type de récepteur sont les cellules basales horizontales (Miwa et al., 1998a, Roskam et al., 1996). Nous avons montré que chez le poulet, les cellules basales horizontales expriment également TrkA (Comte et al., Brain Res devBrain res, Soumis). Ainsi, les HBCs peuvent être définies comme étant le seul type cellulaire exprimant à la fois la kératine et le récepteur à haute affinité pour le NGF. TrkA semble donc dans notre cas un excellent marqueur pour les HBCs.

Nous avons testé l'effet du NGF sur les cultures purifiées de HBCs. Il apparaît que le NGF stimule la prolifération de ce type cellulaire et ceci de manière dose dépendante. Cependant, l'addition de NGF n'augmente que très faiblement le nombre de neurones présents dans ces cultures. Ces résultats sont confirmés par les données

antérieures montrant que l'addition de NGF seul n'augmente ni le nombre ni la survie des neurones présents dans une culture primaire de cellules olfactives murines (Holcomb et al., 1995 ; Roskam et al., 1996). Au contraire, l'absence de NGF du milieu de culture provoque une forte diminution du nombre de neurones (Bakardjiev, 1997). Il semblerait donc que le NGF sécrété par le bulbe et les cellules engainantes ait un effet indirect sur la survie ou la formation de neurones olfactifs. Enfin, le NGF produit par le bulbe joue un rôle essentiel dans le maintien, la régénération et le développement du système olfactif des mammifères (Miwa et al., 2002)

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse concernant le lignage neuronal précédemment décrit. En effet, si les cellules souches présumées de l'épithélium sont les HBCs, le NGF est capable de stimuler leur prolifération. Ainsi l'absence de ce facteur de croissance inhibe la division de ces cellules et donc la formation des précurseurs immédiats que sont les cellules globulaires. Le nombre de neurones formés est par conséquent diminué. De plus, Le NGF n'agit que sur les HBCs en augmentant leur prolifération. Pour stimuler la prolifération des cellules globulaires et donc le nombre de neurones un autre facteur de croissance doit être nécessaire, expliquant ainsi le rôle indirect du NGF sur la production des neurones.

II-4-3 : Le FGF2

Le FGF2 est un facteur de croissance connu pour avoir une implication prédominante dans les processus de neurogenèse au sein de l'ensemble du système nerveux. Il est décrit, selon les cas, comme un activateur de la prolifération des précurseurs immédiats ou de la population neuronale, mais également peut être impliqué dans la différenciation neuronale (Dehamer et al., 1994 ;Farbman et al., 1996, MacDonald et al., 1996). Il semble cependant clairement établi que le FGF2 stimule la prolifération des cellules basales globulaires présentes au sein de l'épithélium olfactif

de souris (Newman et al., 2000). Nos résultats sont en accord avec cette hypothèse, puisque l'action du FGF2 sur les cultures purifiées de HBCs n'est observée qu'une fois que la différenciation au sein de ces cultures a débuté. Les HBCs doivent donc produire des GBCs dont la division est stimulée par le FGF2. L'activation de la division des cellules globulaires est donc en rapport direct avec l'accroissement du nombre de neurones observés dans ces cultures et confirme le rôle de précurseurs immédiats de ces cellules. Cependant le mode d'action de ce facteur de croissance reste encore inconnu. Plusieurs études semblent suggérer que le FGF2 agit sur les cellules globulaires de manière autocrine (secrété par les GBCs elles-même) ou paracrine (comme un signal provenant des neurones ou des cellules de soutien).

III- Interaction mort neuronale/neurogenèse.

L'épithélium olfactif est un des meilleurs modèles pour étudier les interactions entre la mort neuronale et la néo-neurogenèse. L'existence d'un tel lien est maintenant clairement établi, puisqu'une dégénérescence massive provoque quel que soit les espèces étudiées, une neurogenèse accrue (Calof et al., 1995 ; Farbman et al., 1992, Leibovici et al., 1996). Actuellement deux modèles sont suggérés pour expliquer cette interaction : le modèle de stimulation directe et le modèle d'inhibition par rétrocontrôle. Dans le premier cas, les neurones matures en dégénérescence émettraient un signal activant directement la prolifération des précurseurs neuronaux alors que, dans le second cas, lorsque les neurones matures meurent, le taux de BMP4 qu'ils produisent est diminué. Cette diminution serait perçue comme un signal de levée d'inhibition de la prolifération des précurseurs (Calof et al., 2002).

Cependant l'interaction entre ces deux processus ne doit pas se limiter à l'action du BMP4. En effet, des événements à la fois cellulaires et moléculaires pourraient être impliqués dans de tels événements. L'étude de l'expression de Fas, dans des cultures primaires de cellules olfactives humaines, au départ réalisées pour détecter l'apoptose, nous a apporté un nouvel élément concernant les processus impliqués dans ces interactions. En effet, l'expression de Fas est retrouvée dans les cultures primaires au niveau des neurosphères. Il semblerait que les cellules exprimant ce récepteur de mort soient des cellules rondes ne possédant aucun prolongement. Ainsi, ces cellules pourraient être des cellules neuronales relativement immatures (précurseurs ou neuroblastes). Dans tous les cas, la grande majorité des cellules composant les neurosphères sont des cellules en prolifération, ce qui semble paradoxal au regard de leur expression de Fas. De plus, au sein de l'épithélium olfactif de souris *in vivo*, Fas n'est exprimé que dans le tiers supérieur de l'épithélium c'est à dire au niveau de

neurones matures et immatures mais déjà bien engagés dans la voie neuronale (Farbman et al., 1999). Le récepteur Fas et son ligand naturel Fas L, ont été décrits initialement dans des processus d'apoptose lymphocytaires. Mais, récemment l'intervention de ce récepteur a été observée au niveau de processus tels que la régénération, l'activation et la prolifération cellulaire (Desbarats et al., 2002). Il semblerait en effet que Fas soit impliqué dans la croissance neuritique *in vitro* et que le signal médié par ce récepteur passe, dans ce cas par la voie des MAPKinases (Cowley et al., 1994).

Il a été précédemment montré que le NGF stimulait la prolifération des HBCs alors que le FGF2 activait la division des GBCs. Sachant, que le signal intracellulaire médié par ces deux facteurs peut nécessiter l'intervention de la cascade des MAPKinases, on peut donc supposer que toute l'élaboration de la machinerie moléculaire du message prolifératif de Fas serait fonctionnelle au niveau de ces deux types cellulaires. Si Fas joue un rôle d'activation de la prolifération une hypothèse concernant son rôle au sein de l'épithélium olfactif peut être émise :

Fas pourrait jouer un rôle clé dans l'interaction mort neuronale/neurogenèse. En effet, lorsqu'un neurone entre en dégénérescence, il secrète Fas ligand (Farbman et al., 1999). Si le récepteur Fas est exprimé à la fois par les neurones et les cellules basales de l'épithélium, on peut supposer que la fixation de FasL dans le premier cas va entraîner la dégénérescence neuronale mais parallèlement et pratiquement de manière synchrone, la fixation du ligand au niveau des cellules basales active leur division de manière à compenser la perte neuronale. L'absence d'expression de Fas dans la partie basale de l'épithélium olfactif *in vivo* (Farbman et al., 1999), pourrait s'expliquer par le fait qu'*in vitro*, les contacts cellulaires sont modifiés. Ainsi, la perte des contacts entre les neurones et les cellules basales pourrait aboutir à l'expression par ces dernières du récepteur Fas, les préparant ainsi à être activées et donc permettant la formation de nouveaux neurones. Cependant, cette hypothèse demeure incertaine et devra être vérifiée par de nombreuses études expérimentales.

Conclusion et perspectives

Le système olfactif représente un modèle unique pour l'étude de la mort neuronale, de la neurogenèse et de l'interaction existant entre ces deux processus. Au cours de l'ensemble de ce travail, nous avons essayé de mieux comprendre les différents événements régissant ces phénomènes au sein de l'épithélium olfactif aviaire. Ainsi, il a été montré que les cellules neurosensorielles lésées après axotomie se comportent différemment selon leur degré de maturation et leur environnement. Il apparaît donc que les neurones matures localisés dans un épithélium adulte soient plus sensibles à l'axotomie que les neurones embryonnaires. **Ces observations démontrent la grande importance de l'environnement trophique des neurones olfactifs.** Notre recherche de marqueurs des différents types cellulaires de l'épithélium olfactif aviaire nous a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes exprimés par les cellules basales ou les neurones immatures et pouvant donc servir de marqueurs de ces cellules et notamment de cellules souches neurales centrales et périphériques. Toutefois, cette étude devra être poursuivie pour compléter leur identification et dévoiler leur fonctions et leur mécanisme d'action.

Les cellules basales horizontales exprimant chez le poulet comme chez les mammifères, la kératine et le récepteur à haute affinité pour le NGF, TrkA, se comportent bien comme des cellules souches *in vitro*. De plus, de nombreux résultats mêlant des études *in vitro* et *in vivo* apparaissent également corroborer cette observation. Suite à l'ensemble de ces travaux, une hypothèse a donc pu être émise concernant le lignage des cellules olfactives. **Il semblerait que les HBCs soient les cellules souches de l'épithélium** et que leur prolifération soit activée par le NGF. Ces cellules pourraient alors à chaque division produire une nouvelle cellule souche et une cellule basale globulaire. Les GBCs définies comme des précurseurs neuronaux seraient à

leur tour capables de se diviser sous l'effet du FGF2 pour donner une nouvelle cellule GBCs et un neuroblaste qui en se différenciant formera un neurone olfactif fonctionnel (Figure 12). Cependant et sachant qu'il existe deux sous-types de GBCs, l'action précise du FGF2 sur l'un ou chacun de ces deux types cellulaire devra être précisée.

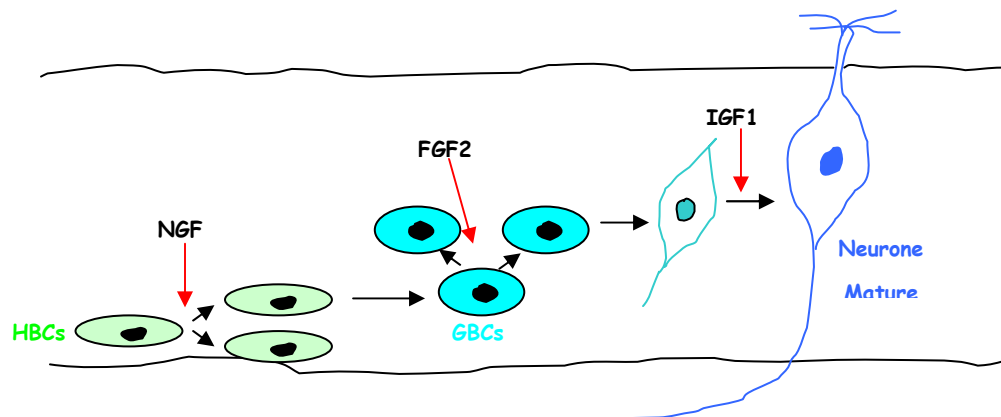


Figure 12 : Hypothèse émise concernant le lignage neuronal au sein de l'épithélium olfactif.

Lors de ces études, nous avons également montré que L'IGF-1 pouvait avoir une action anti-apoptotique et de maintien de la différenciation sur les neurones olfactifs. L'effet de ce facteur de croissance sur les cellules basales horizontales devra être envisagé de manière à définir précisément le rôle complet de l'IGF-1 au sein du système olfactif. Les études visant à détecter l'expression du récepteur Fas au niveau de cultures primaires de cellules olfactives humaines semblent montrer que cette protéine jouerait un rôle clé dans l'interaction mort neuronale/neurogenèse. Cependant de nombreux éléments doivent encore être apportés pour confirmer cette hypothèse. En premier lieu, il serait intéressant de savoir si les cellules exprimant Fas, sont des cellules apoptotiques ou non, puis en bloquant soit l'expression de Fas, soit la fixation de son ligand étudier les événements qui en découlent.

Enfin, les résultats des greffes d'HBCs initiées au cours de cette thèse devront être approfondis. Nous avons montré que ces cellules étaient capables de survivre, de se

multiplier et de s'implanter au niveau du mésencéphale d'un embryon de poulet de 3 jours. Cependant, même si morphologiquement ces cellules semblent se différencier, ces observations devront être confirmées par des études immunohistologiques. En effet, il est important de savoir si ces cellules sont capables de se différencier en cellules neuronales et, si cela est le cas, si elles gardent leurs critères olfactifs ou au contraire acquièrent les caractéristiques des cellules neuronales de la structure dans laquelle elles se différencient. D'autre part, une démarche similaire devra être appliquée au niveau de poulet adulte. Les greffes de cellules souches au niveau des ventricules latéraux d'un poulet adulte ont déjà été initiées. Lorsque ces techniques seront mises au point et que les événements régissant la prolifération et la différenciation des cellules souches seront mieux compris et maîtrisés, une application thérapeutique de cette étude pourra être envisagée. Ainsi, des cellules souches isolées à partir de fragments d'épithélium prélevés sur un patient atteint de maladie neurodégénérative, ou de lésion nerveuse accidentelles pourront être greffées. Ces greffes présentent un avantage considérable puisque s'agissant d'autogreffes elles réduisent considérablement le risque de rejet.

En conclusion, l'ensemble de cette étude a permis d'apporter quelques éléments permettant de mieux comprendre les mécanismes complexes régissant la neurogenèse, la mort neuronale et l'interaction entre ces deux phénomènes et de caractériser les cellules souches à la base de cette neurogenèse. Cependant, des interrogations demeurent et des perspectives sont ouvertes. Il est d'autant plus complexe de les résoudre, qu'*in vivo*, l'ensemble de ces phénomènes interagissent les uns avec les autres que ce soit au niveau cellulaire et/ou moléculaire.

Bibliographie

-A-

- ALVAREZ-BUYLLA A, GARCIA-VERDUGO JM, TRAMONTIN AD. 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* **2** :287-293.
- ANDRES KH.1966. Der Feinbau der Regio olfactoria von Makrosomatikern. *Z:Zelforsch.* **69**:140-154.
- ARMSTRONG DM, BRADY R, HERSH LB, HAYES RC, WILEY RG. 1991. Expression of choline acetyltransferase and nerve growth factor receptor within hypoglossal motoneurons following nerve injury. *J Comp. Neurol.* **304**:596-607.
- _ Arsenijevic Y, Villemure JG, Brunet JF. 2001. Isolation of multipotent neural precursors residing in the cortex of the adult human brain. *Exp Neurol.* **170**: 48-62.
- AYER-LE LIÈVRE C, STAHLBOM PA, SARA V. 1991. Expression of IGF-I and -II mRNA in the brain craniofacial region of the rat fetus. *Development.* **111**:105-115.
- AYER-LE LIEVRE C, LAPOINTE F, LEIBOVICI M. 1995. Avian olfactory neurogenesis. *Biol Cell.* **84**:25-34.
- Ayer-Le Lièvre C. Le développement du système olfactif principal, in *Chimie Sensorialité*. A. Faurion (Editeur), Publication Lavoisier, Paris, *in press*.

-B-

- BAIRD A. 1994. Fibroblast growth factors: activities and significance of non-neurotrophin neurotrophic growth factors. *Cur opinion neuro.* **4** :78-96.
- BAKARDJIEV A. 1997. Biosynthesis of carnosine in primary cultures of rat olfactory bulb. *Neurosciences letters.* **227**:115-118.
- BARBACID M. 1994. The Trk family of neurotrophic receptors. *J. Neurobio.* **25**:1386-1403.

- BARRETT GL, BARTLETT PF. 1994. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 6501-6505.
- BAULIDA J, KRAUS M, ALIMANDI M, DI FIORE P, CARPENTER G. 1996. All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem*. **271**:5251-5257.
- BAUMEISTER H, GRONOSTAJSKI RM, LYONS GE, MARGOLIS FL. 1999. Identification of NFI-binding sites and cloning of NFICDNAs suggest a regulatory role of NFI transcription factors in olfactory neuron gene expression. *Mol Brain Res*. **72**: 65-79.
- BEDFORD FK, JULIUS D, INGRAHAM HA. 1998. Neuronal expression of the 5HT3 serotonin receptor gene requires nuclear factor 1 complexes. *J Neurosci*. **18**: 6186-6194.
- BEHRENS M, VENKATRAMAN G, GRONOSTAJSKI RM, REED RR, MARGOLIS FL. 2000. NFI in the development of the olfactory neuroepithelium and the regulation of olfactory marker protein gene expression. *Eur J Neurosci*. **12** : 1372-1384.
- BEN-OR S, OKRET S. 1993. Involvement of a C/EBP like protein in the acquisition of responsiveness to glucocorticoid hormones during chick neural retinal development. *Mol. Cell. Biol*. **13**:331-340.
- BERTRAND N, CASTRO DS, GUILLEMOT F. 2002. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci*. **3(7)** :517-30.
- BECK KD, POWELL BRAXTON L, WIDMER HR, VALVERDE J, HEFTI F. 1995. IgfI gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons. *Neuron*. **14**:717-730.
- BONDY C. 1991. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci*. **13**:5092-5104.
- BONFANTI L, PERETTO P, MERGHI A, FASOLO A. 1997. Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accessory olfactory bulb of the adult rat. *Neuroscience*. **81**:489-502.
- BRUNJES P.C. and FRAZIER L.L. 1986. Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. *Brain Research Reviews*. **11**:1-45.
- BUCK L, and AXEL R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*. **65**: 175-187.
- BUREK M.J. OPPENHEIM R.W. 1998. Cellular interactions that regulate programmed cell death in the developing vertebrate nervous system. In: Ratan VkaR. Cell death and diseases of the nervous system. *Ottawa: Humana Press*, p 145-179.
- BURT D, PATON I. 1992. Evolutionary origins of the transforming growth factor beta gene family. *DNA Cell Biol*. **11**:497-510.

-C-

- CAGGIANO M, KAUER JS, AND HUNTER DD. 1994. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* **13**:339-352.
- CALOF AL, CHIKARAISHI DM. 1989. Analysis of neurogenesis in a mammalian neuroepithelium: Proliferation and differentiation of an olfactory neuron precursor *in vitro*. *Neuron*. **3**: 115-127.
- CALOF AL, HAGIWARA N, HOLOCOMB JD, MUMM JS, SHOU J. 1996. Neurogenesis and cell death in olfactory epithelium. *J Neurobiol* **30**:67-81.
- CALOF AL, BONNIN A, CROCKER C, KAWAUCHI S, Murray RC, SHOU J and WU HH. 2002. Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microsc. Res. Tech.* **58**: 176-188.
- CARR VM and FARBMAN AI. 1993. the dynamics of cell death in the olfactory epithelium. *Exp Neurol* **115**:55-59.
- _ Carpenter MK, Cui X, Hu ZY. 1999. *In vitro* expansion of a multipotent population of human neural progenitor cells. *Exp Neurol*. **158**:265-278.
- CAU E, GRADWOHL G, FODE C, GUILLEMOT F. 1997. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development*. **124**:1611-1621.
- CAU E, CASAROSA S, GUILLEMOT F. 2002. Mash 1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development*. **129(8)**: 1871-80.
- CHEN Y, GETCHELL ML, DING X, GETCHELL TV. 1992. Immunolocalization of two cytochrome P450 isozymes in rat nasal chemosensory tissue. *Neuroreport*. **3**:749-752.
- CHUAH PG, AU C. 1991. Olfactory schwann cells are derived from precursor cells in the olfactory epithelium. *J. Neuroscience. Res.* **29**:172-180.
- CICCOLINI F, SVENDSEN CN. 1998. Fibroblast growth factor 2 (FGF2) promotes acquisition of epidermal growth factor (EGF) responsiveness in mouse striatal precursors cells: identification of neural precursors responding to both EGF and FGF-2. *J Neurosci*. **18**:7869-7880.
- CLARKE P.G.H. 1990. Developmental cell death. Morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol*. **181**: 195-213.
- COCHARD P, PAULIN D. 1984. Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo *in vivo*. *J Neuroscience*. **4**:2080-2094.

- COHEN S, LEVI-MONTALCINI R, HAMBURGER V. 1954. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcoma 37 and 180. *Proc Natl Acad Sci USA*. **40**:1014-1018.
- CORONAS V, FERON F, HEN R, SICARD G, JOURDAN F, MOYSE E. 1997. *In vitro* induction of apoptosis or differentiation by dopamine in an immortalized olfactory neuronal cell line. *J Neurochem*. **69**:1870-1881.
- COSTANZO R.M, GRAZIADEI P.P. 1983. A quantitative analysis of changes in the olfactory epithelium following bulbectomy in hamster. *J. Comp. Neurol*. **215**:370-381.
- COTSARELIS G, CHENG SZ, DONG G, SUN TT, LAVKER RM. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. **57**:201-209.
- COULY GF, LE DOUARIN NM. 1985. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. I. Developmental relationships between placodes, facial ectoderm, and prosencephalon. *Dev. Biol*. **110**:422-439.
- COULY GF, LE DOUARIN NM. 1987. Mapping of the early neural primordium in quail-chick chimeras. II. The prosencephalic neural plate and neural folds: implications for the genesis of cephalic human congenital abnormalities. *Dev. Biol*. **120**:198-214.
- CROUCHER SJ, TICKLE C. 1989. Characterization of epithelial domains in the nasal passages of chick embryos: spatial and temporal mapping of a range of extracellular matrix and cell surface molecules during development of the nasal placodes. *Development*. **106**:493-509.
- COWAN C, THAI J, NICHOLSON D, KAUFMAN S, KRAJEWSKI S, ROSKAMS A.J. 2001. Caspases 3 and 9 carry a pro-apoptotic signal from synapse of cell body in olfactory neurons. *J. Neurosci*. **21**(13):7099-7109.
- COWLEY S., PATERSON H., KEMP P., MARSHALL C.J. 1994. Activation of MAPkinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH3T3 cells. *Cell*. **77**:841-852.
- CRIBBS LL, LEE JH, SATIN J, ZHANG Y, DAUD A, BARCLAY J, WILLIAMSON MP, FOX M, REES M, PEREZ-REYES E. 1998. Cloning and characterization of $\alpha 1H$ from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ Res*. **83**:103-109.

-D-

- _ DE CARLOS JA, LOPEZ-MASCARAQUE L, VAVERDE F. 1995. The telencephalic vesicles are innervated by olfactory placode-derived cells: a possible mechanism to induce neocortical development. *Neuroscience*. **68**: 1167-1178.

- DECKNER ML, FRIS NJ, VERGE VMK, H'KFLET T, RISLING M. 1993. Localization of neurotrophin receptors in olfactory epithelium and bulb. *Neuroreport*. **5**:301-304.
- _ DEHAMER MK, GUEVARA JL, HANNON K, OLWIN BB, CALOF AL. 1994. Genesis of olfactory receptor neurons *in vitro*: regulation of progenitor cell division by fibroblast growth factor. *Neuron*. **13**:1083-1097.
- DING X, COON MJ. 1988. Purification and characterization of two unique forms of cytochrome P450 from rabbit nasal microsomes. *Biochemistry*. **27**:8330-8337.
- DUCRAY A, BONDIER JR, MICHEL G, BON K, PROPPER A, KASTNER A. 2002. Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice. *Eur J Neurosci*. **15**:1907-1917.

-E-

- ENGELE J, BOHN M. 1992. Effects of acidic and basic fibroblast growth factors (aFGF, bFGF) on glial precursor cell proliferation: age dependency and brain region specificity. *Dev Biol*. **15**:363-372.
- ENSOLI F, FIORELLI V, VANNELLI B, BARNI T, DE CRISTOFARO M, ENSOLI B, THIELE C. 1998. Basic fibroblast growth factor supports human olfactory neurogenesis by autocrine/paracrine mechanisms. *Neurosci*. **86**:881-893.
- EZEH P, FARBMAN A. 1998. differential activation of ErbB receptors in the rat olfactory mucosa by transforming growth factor alpha and epidermal growth factor *in vivo*. *J Neurobiol*. **37**:199-210.

-F-

- FARBMAN AL. 1990. Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *TINS* **13**:362-366
- FARBMAN AL. 1992. Cell biology of olfaction. Cambridge University Press.
- FARBMAN A, BUCHOLZ JS, BRUCH RC. 1994. Growth factor regulation of olfactory cell proliferation. *Olfaction and Taste XI*. Springer-Verlag Tokyo. pp45-48.

- FARBMAN A, BUCHOLZ JS. 1996. Transforming growth factor- α and other growth factors stimulate cell division in olfactory epithelium *in vitro*. *J Neurobiol.* **30**:267-280.
- FARBMAN AI, BUCHOLZ JA, SUZUKI Y, COINES A, SPEERT D. 1999. A molecular basis of cell death in olfactory epithelium. *J Comp Neurol.* **414**:306-304.
- FEDERICO G, MAREMMANI C, CINQUANTA L, BARONCELLI G, FATTORI B, SAGGESE G. 1999. Mucus of the human olfactory epithelium contains the insulin-like growth factor-I system which is altered in some neurodegenerative diseases. *Brain Research.* **835**:306-314.
- FERON F, MACKAY-SIM A, ANDRIEU JL, MATTHAEL KI, HOLLEY A, SICARD G. (1999). Stress induces neurogenesis in non_neuronal cell cultures of adult olfactory epithelium. *Neurosci.* **88**(2):571-583.
- FRICKER RA, CARPENTER MK, WINKLER C, GRECO C, GATES MA, BJORKLUND A. 1999. Site specific migration and neuronal differentiation of human neural progenitor cells after transplantation in the adult rat brain. *J Neurosci.* **19**: 5990-6005.

-G-

- GAGE FH, COATES PW, PALMER TD, KUHN HG, FISHER LJ, SUHONEN Jo, PETERSON DA, SUHR ST, RAY J. 1995. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**:11879-11883.
- GIACOBINI M, ZETTERSTROM R, YOUNG D, HOFFER B, SARA V, OLSON L. 1995. IGF-1 influences olfactory bulb maturation. Evidence from anti-IGF-1 antibody treatment of developing graft in oculo. *Dev Brain Res.* **84**:67-76.
- GOLDSTEIN B.J. and SCHWOB J.E. 1996. Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells. *J Neurosc.* **16**12:4005-4016.
- _ GOLDSTEIN BJ, WOLOZIN BL, SCHWOB JE. 1997. FGF2 suppresses neurogenesis of a cell line derived from rat olfactory epithelium. *J Neurobiol.* **33**: 411-428.
- GONG Q, BAILEY MS, PIXLEY SK, ENNIS M, LIU W, SHIPLEY MT. 1994. Localization and regulation of low affinity nerve growth factor receptor expression in the rat olfactory system during development and regeneration. *J Comp. Neurol.* **344**: 336-348.
- GORDON MK, MUMM JS, DAVIS RA, HOLCOMB JD, CALOF AL. 1995. Dynamics of mash1 expression *in vitro* and *in vivo* suggest a non-stem cell site of mash1 action in the olfactory receptor neuron lineage. *Mol Cell Neurosci.* **6**:363-379.
- GRAZIADEI PPC. 1973. Cell dynamics in the olfactory mucosa. *Tissue&Cell.* **5**:113-131.

- GRAZIADEI PP, OKANO M. 1979. Neuronal degeneration and regeneration in the olfactory epithelium of pigeon following transection of the first cranial nerve. *Acta Anat (Basel)*. 104(2) :220-36.

- GRAZIADEI PPC, MONTI GRAZIADEI GA. 1978. The olfactory system : a model for the study of neurogenesis and axon regeneration in mammals. In: Cotman CW. Editor. Neuronal plasticity. New York: Raven Press, p131-153.

- GRAZIADEI PPC, GRAZIADEI GA. 1979a. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol.* 8:1-18.

- GRAZIADEI PPC, MONTI- GRAZIADEI GA. 1979b. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J. Neurocytol.* 8 (2): 197-213.

- GRAZIADEI PP, LEVINE RR, MONTI- GRAZIADEI GA. 1979c. Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neuro-science.* 4:713-727.

- GRAZIADEI PPC, MONTI- GRAZIADEI GA. 1980. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. III. Deafferentation and reinnervation in the olfactory bulb following section of the filia olfactoria in rat. *J. Neurocytol.* 9 : 145-162.

- GRITTI A, FROLICHSTHAL-SCHOELLER P, GALLI R, PARATI E, COVA L, PAGANO S, BJORNSON C VESCOVI A. 1999. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci.* 19:3287-3297.

- GRITTI A, PARATI E, COVA L, FROLICHSTHAL P, GALLI R, WANKE E, FARAVELLI L, MORASSUTTI DJ, ROISEN F, NICKEL DD, VESCOVI A. 1996. Multipotent stem cells from the adult mouse brain proliferate and self renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci.* 16:1091-1100.

- GUILLEMOT F, LO CC, JONHSON JE, AUERBACH A, ANDERSON A, ANDERSON DJ, EBENDAL T. 1993. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell*75:463-476.

- GUTHRIE K, GALL C. 1991. Differential expression of messenger RNAs for the NGF family of neurotrophic factors in the adult rat central olfactory system. *J Comp Neurol.* 313:95-102.

-H-

- HARDING J.W. GETCHELL T.V. MARGOLIS F.L. 1978. Denervation of the primary olfactory pathway in mice. V. Long term effect of intranasal ZNSO4 irrigation on behaviour, biochemistry and morphology. *Brain Res.* **140**:271-285.
- HEMPSTEAD J.L., MORGAN J.I. 1985. A panel of monoclonal antibodies to the rat olfactory epithelium. *J Neurosc.* **5**:438-449.
- HOLCOMB J.D. MUMM J.S. CALOF A.L. 1995. Apoptosis in the neuronal lineage of the mouse olfactory epithelium: regulation *in vivo* and *in vitro*. *Dev. Biol.* **172**: 307-323.
- HOLBROOK EH, SZUMOWSKI KEM, SCHWOB JE. 1995. An immunochemical, ultrastructural and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. *J Comp Neurol.* **363**:129
- HOLZENBERGER M, LAPOINTE F, LEIBOVICI M, AYER- LE LIÈVRE C. 1996. The avian IGF type 1 receptor : cDNA analysis and in situ hybridisation reveal conserved sequence elements and expression patterns relevant for the development of the nervous system. *Dev Brain Res.* **97**:76-87.
- HOLZENBERGER M, LAPOINTE F, AYER- LE LIÈVRE C. 2000. Expression of insulin like growth factor-1 (IGF1) and IGF2 in the avian brain: relationship of in situ hybridisation patterns with IGF type 1 receptor expression. *Int J Dev Neurosci.* **18** :69-82.
- HUARD JM, SCHWOB JE. 1995. Cell cycle of globose basal cells in rat olfactory epithelium. *Dev Dyn.* **203**:17-26.

-J-

- JENNINGS JA, HAMBRIGHT KEIGER CJ, WALKER JC. 1995. Time course of reinnervation of the olfactory bulb after transection of the primary olfactory nerve in the pigeon. *Brain Res* **683**:159-163.
- JOHASSON CB, MOMMA S, CLARKE DL, RISLING M, LENDAHL U, FRISEN J. 1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell.* **96**:25-34.

-K-

- KALYANI A, HOBSON K, RAO MS. 1997. Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization and clonal analysis. *Dev Biol.* **186**: 202-223.
- KAPLAN DR, MILLER FD. 2000. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* **10**: 381-391.
- _ KEY B, TRELOAR H, WANGEREK L, FORD M, NURCOMBE V. 1996. Expression and localization of FGF-1 in the developing rat olfactory system. *J Comp. Neurol.* **366**: 197-206.

-L-

- LANCET D. 1986. Vertebrate olfactory reception. *Annu Rev Neurosci.* **9**:329-55.
- LE DOUARIN. 1973. A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev Biol.* **30**:217-222.
- LEIBOVICI M, LAPOINTE F, ALETTA P, AYER-LE LIEVRE C. 1996. Avian olfactory receptors : differentiation of olfactory neurons under normal and experimental conditions. *Dev Biol.* **175**:118-31.
- LE GROS CLARK W.E. 1951. The projection of the olfactory epithelium on the olfactory bulb in the rabbit. *J Neurol. Psychiatry.* **14**:1-10.
- LOIS C, ALVAREZ-BUYLLA A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science.* **264**:1145-1148.
- LOO AT, YOUNG SL, KENT PF, SCHWOB JE. 1996. The aging olfactory epithelium: neurogenesis, response to damage, and odorant-induced activity. *Int J Dev Neuroscience* **14**:881-900.

-M-

- MAC DONALD KPA, MURRELL WG, BARTLETT PF, BUSHELL GR, MACKAY-SIM A. 1996. FGF2 promotes neuronal differentiation in explants cultures of adult and embryonic mouse olfactory epithelium. *J Neurosci Res.* **44** :27-39.
- MACKAY-SIM A, PATEL U. 1984. Regional differences in cell genesis in the olfactory epithelium of the salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Exp Brain Res.* **57**:99-106.
- MAHANTAPPA NK, SCHWARTING GA. 1993. Peptide growth factor control of the olfactory neurogenesis and neuron survival in vitro: roles of EGF and TGF- α . *Neuron.* **10**:293-305.

- MARGOLIS FL. 1972. A brain protein unique to the olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **69**:1221-1224.
- MASSAGUE J. 1996. TGF β signaling : receptors, transducers and Mad proteins. *Cell*. **85**:947-950.
- MATHONNET M, LALLOUÉ F, PETIT B, COMTE I, LEBOUTET MJ, AYER-LE LIÈVRE C. 2002. Differential responses of olfactory neurons to deafferentation at embryonic and post-natal stages. *Neurosciences* **2(109)**: 207-217.
- MAYER E, DUNNETT S, FAWCETT J. 1993. Mitogenic effect of basic fibroblast growth factor on embryonic ventral mesencephalic dopaminergic neurone precursors. *Dev brain Res*. **72**:253-258.
- MEAKIN SO, SHOOTER EM. 1992. The nerve growth factor family of receptors. *Trends in neurosciences*. **15**: 323-331.
- MEIRI KF, BICKERSTAFF LE, SCHWOB JE. 1991. Monoclonal antibodies show that kinase C phosphorylation of GAP-43 during axonogenesis is both spatially and temporally restricted *in vivo*. *J Cell Biol*. **112**:991-1005.
- Menco BPhM and FARBMAN AI. 1985. Genesis of cilia and microvilli of rat nasal epithelia during pre-natal development. II. Olfactory epithelium, a morphometric analysis. *J. Cell. Sci*. **78**:311-336.
- MIRAGALL F, MONTI GRAZIADEI GA. 1982. Experimental studies on the olfactory marker protein II. Appearance of the olfactory marker protein during differentiation of the olfactory sensory neurons of mouse: An immunohistochemical and autoradiographic study. *Brain Res*. **329**:245-250.
- MIWA T, HORIKAWA I, URAMOTO N, ISHIMARU T, YAMAMOTO K, FURUKAWA M, KATO T, MORIIZUMI T. 1998a. TrkA expression in mouse olfactory tract following axotomy of olfactory nerves. *Acta Otolaryngologica*. **539**:79-82.
- MIWA T URAMOTO N, ISHIMARU T, FURUKAWA M, YAMAMOTO K, SHIBA K, MORIIZUMI T. 1998b. Retrograde transport of nerve growth factor from the olfactory bulb to olfactory epithelium. *Neuroreport* **9**: 153-155.
- MIWA T, MORIIZUMI T, HORIKAWA I, URAMOTO N, ISHIMARU T, NISHIMURA T, FURUKAWA M. 2002. Role of the Nerve Growth factor in the Olfactory system. *Microsc Res Tech*. **58**:197-203.
- MOREAU M, LECLERC C, GUALANDRIS-PARISOT L, DUPRAT AM. 1994. Increased internal Ca²⁺ mediates neural induction in the amphibian embryo. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**: 12639-43.
- MOULTON D.G. FINK R.P. 1972. Cell proliferation and migration in the olfactory epithelium. In olfaction and Tast. *Verglas-Gesellschaft, Stuttgart*, pp 20-6.
- MORRISON E.E. COSTANZO R.M. 1989. Scanning electron microscopic study of degeneration and regeneration in the olfactory epithelium after axotomy. *J Neurocytol*. **18**: 393-405.

- MORRISON SJ, Shah NM, ANDERSON DJ. 1997. Regulatory mechanisms in stem cells biology. *Cell*. **88**:287-298.
- MUMM JS, SHOU J, CALOF AL. 1996. Colony-forming progenitors from mouse olfactory epithelium: evidence for feedback regulation of neuron production. *Proc Nat Acad Sci USA*. **93**:11167-11172.
- MURAKAMI S, SEKI T, RUTISHAUSER and RAI Y. 2000. Enzymatic removal of polysialic acid from neural cell adhesion molecule perturbs the migration route of luteinizing hormon-releasing hormon neurons in the developing chick forebrain. *J Comp.Neurol*. **420**:171-181.

-N-

- NAKAMURA H, FUNAHASHI J. (2001). Introduction of DNA into Chick embryos by *in ovo* electroporation . *Methods*. **24**:43-48.
- NEWMAN M, FERON F, MACKAY-SIM A. 2000. Growth factor regulation of neurogenesis in adulte olfactory epithelium. *Neuroscience*. **99(2)**:343-50.
- NIELSEN F, GAMMELTOFT S. 1990. Mannose-6-phosphate stimulates proliferation of neuronal precursor cells. *FEBS letter*. **262**: 142-144.
- NORGREN RBJr, BRACKENBURY R. 1993. Cell adhesion molecules and the migration of LHRH neurons during development . *Dev Biol*. **160**:377-387.

-O-

- OHOBAYASHI N, HOSHIKAWA M, KIMURA S, YAMASAKI M, FUKUI s, ITOH N. 1998. Structure and expression of the mRNA encoding region of nouvel fibroblast growth factor, FGF 18. *J Bio Chem*. **273**:18161-18164.
- Olson L, Ayer-Le Lièvre C, Bygdeman M, Ebendal T, Ernfors P, Eriksson-Nilsson M. 1989. Brain tissue transplantation an growth factors : basic research and clinical applications. *Progress in Brain Res*. **82**:55-66
- OPPENHEIM R.W. HOUENOU L.J. JOHNSON J.E. LIN L.F. LI L. LO A.C. NEURSOME A.L. PREUETTE D.M. WANG S. 1995. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature*. **373**: 344-346.

-P-

- PALLERA AM, SCHWEITZER JB, BOOK AA, WILEY RG. 1994. 192 IgG-saporin causes a major loss of synaptic content in rat olfactory bulb. *Exp Neurol.* **127**:265-277.
- PANICKER M, RAO MS. 2000. stem cells and neurogenesis. *CSH Press.*
- PELLIER V. and ASTIC L. 1994a. Histochemical and immunocytochemical study of the migration of neurons from the rat olfactory placodes. *Cell Tissue Res.* **275**:587-598.
- PELLIER V, ASTIC L. 1994b. Cell death in the developing olfactory epithelium of rats embryos. *Dev. Brain. Res.* **79**:307-315.
- PELLIER V, ASTIC L, OESTREICHER AB, SAUCIER D. 1994c. B-50/GAP-43 expression by the olfactory receptor cells and the neurons migrating from the olfactory placode in embryonic rats. *Dev. Brain. Res.* **80**:63-72.
- PELTON R, DICKINSON M, MOSES H, HOGAN B. 1990. In situ hybridisation analysis of TGF β 3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGF β 1 and β 2. *Development.* **110**:609-620.
- PEREZ-REYES E, CRIBBS LL, DAUD A, LACERDA AE, BARCLAY J, WILLIAMSON MP, FOX M, REES M, LEE JH. 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature.* **391**:896-899.
- PIXLEY S, DANGORIA N, ODOMS K, HASTINGS L. 1998. Effects of insulin-like growth factor 1 on olfactory neurogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **855**: 244-247.
- PUMA P, BUXSER SE, WATSON L, KELLEHER DJ, JOHNSON GL. 1983. Purification of the receptor for the nerve growth factor from A875 melanoma cells by affinity chromatography. *J Biol Chem.* **258**:3370-3375.

-R-

- RAMA KRISHNA NS, LITTLE SS, GETCHELL TV. 1996. Epidermal growth factor receptor m RNA and protein are expressed in progenitor cells of the olfactory epithelium. *J Comp Neurol.* **373**:297-307.

- RECHLER M, NISSLEY S. 1990. Insulin-like growth factor. In: Sporn M, Roberts A. (Eds). *Peptide growth factors and their receptors*. Vol 1. Springer-verlag, New York, pp 263-367.
- RICHARDS L, KILPATRICK T, BARTLETT P. 1992. De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Nat Acad Sci USA*. **89**:8591-8595.
- RIESE D, KIM E, ELENUS K, BUCKLEY S, KLAGSBRUN M, PLOWMAN G, STERN D. 1996. The epidermal growth factor receptor couples transforming growth factor-alpha, heparin-binding epidermal growth factor-like factor and amphiregulin to Neu, ErbB-3 and ErbB-4. *J Biol Chem*. **271**:20047-20052.
- RIETZE R, POULIN P, WEISS S. 2000. Mitotically active cells that generate neurons and astrocytes are present in multiple regions of the adult mouse hippocampus. *J Comp Neurol*. **427**:397-408.
- REYNOLDS BA, TETZLAFF W, WEISS S. 1992. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*. **12(11)**:4565-74.
- ROTWEIN P, BURGESS SK, MILBRANDT JD, KRAUSE JE. 1988. Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc Nat Acad Sci USA*. **85**:265-269.
- ROSKAMS AJ, BETHEL MA, HURT KJ, RONNETT GV. 1996. Sequential expression of Trks A, B and C in the regenerating olfactory neuroepithelium. *J Neurosci*. **16**:1294-1307.
- ROUX PP, COLICOS MA, BARKER PA, KENNEDY TE. 1999. p75 neurotrophin receptor expression is induced in apoptotic neurons after seizure. *J Neurosci*. **19**: 6887-6896.
- ROY NS, WANG S, JIANG L, KANG J, BENRAISS a, HARRISON-RESTELLI C, FRASER RA, COULDWELL WT, KAWAGUCHI A, OKANO H, NEDERGAARD M, GOLDMAN SA. 2000. In vitro neurogenesis by progenitors cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat Med*. **6**: 271-277.
- RUPP RA, KRUSE U, MULTHAUP G, GOBEL U, BEYREUTHE SIPPEN AE. 1990. Chicken NFI/TGGCA proteins are encoded by at least three independent genes: NFI-A, NFI-B, and NFI-C with homology mammalian genomes. *Nucleic Acids Res*. **18(9)**: 2607-2616.
- RUSSEL JW, CHENG HL, GOLOVOY D. 2000. Insulin-like growth factor-1 promotes myelination of peripheral sensory axons. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**:575-584.

-S-

- SATOH M, TAKEUCHI M. (1995). Induction of NCAM expression in mouse olfactory keratin-positive basal cells in vitro. *Dev Brain Res*. **87**:111-119.
- SCHWANZEL-FUKUDA M, PFAFF DW. 1989. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*. **338(6211)**:161-4.

- SCHWANZEL-FUKUDA M, PFAFF DW. 1991. Migration of LHRH-immunoreactive neurons from the olfactory placode rationalizes olfacto-hormonal relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **39**:565-72.
- SCHWARTZ LEVEY M, CHIKARAISHI DM, KAUER JS. 1991. Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography. *J Neurosci.* **11**:3556-3564.
- SHOU J, RIM P, Calof A. 1999. BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor. *Nat Neurosci.* **2**:339-345.
- SCHWARTZ LEVEY M, CHIKARAISHI DM, KAUER JS. 1991. Characterization of potential precursor populations in the mouse olfactory epithelium using immunocytochemistry and autoradiography. *J Neuroscience.* **6**:208-217.
- SCHWOB JE, YOUNGENTOB SL, MEZZA RC. 1995. Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide induced lesion. *J Comp Neurol.* **359**:15-37.
- SCHWOB JE, YOUNGENTOB SL. 1992. Reconstitution of the olfactory epithelium and reinnervation of the olfactory bulb after methyl bromide lesions. *Chem Senses.* **17**: 696.
- _ SMITH CG. 1951. Regeneration of sensory epithelium and nerves in adult frogs. *Anat Rec.* **109**:661-671.
- SUHONEN Jo, PETERSON DA, RAY J GAGE FH. 1996. Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons *in vivo*. *Nature.* **383**:624-627.
- SUSUKI Y, TAKEDA M. 1991. Keratins in developing olfactory epithelia. *Brain Res Dev brain Res.* **59**:171-178.

-T-

- TAROZZO G, DE ANDREA M, FEUILLOLEY M, VAUDRY H, FASOLO A. 1998. Molecular and cellular guidance of neuronal migration in the developing olfactory system of rodents. *Ann N Y Acad Sci.* **839**: 196-200.
- TEN DIJKE P, MIYAZONO K, HELDIN CH. 1998. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr opin cell biol.* **8**: 139-145.
- THORGEIRSSON SS. (1996). Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J.* **10**:1249-1256.
- TROPEPE V, SIBILIA M, CIRUNA BG, ROSSANT J, WAGNER EF, VAN DER KOOY D. 1999. Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol.* **208**(1):166-88.

- TURNER CP, PEREZ-POLO JR. 1992. Regulation of the low affinity receptor for the nerve growth factor, p75NGFR, in the olfactory system of the neonatal and adult rat. *Int Dev Neurosci.* **10** : 343-359.
- TURNER CP, PEREZ-POLO JR. 1993. Expression of p75 NGFR in the olfactory system following peripheral deafferentation. *Neuroreport.* **4**: 1023-1026.

-U-

- Uchida N, Buck D, He D. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**: 14720-14725.

-V-

- 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 luteizing hormone-releasing hormone (LHRH). *Dev. Brain. Res.* **71** :209-220.
- VAN CAMPENHOUT E. 1937. Le développement du système nerveux crânien chez le poulet. *Anch Biol.* **48**:611-666.
- VERHAAGEN J, OESTREICHER AB, GISPEN WH, MARGOLIS FL. 1989. The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci.* **9**:683-691.
- Vescovi AL, Parati EA, Gritti A. 1999. Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cells lines by epigenetic stimulation. *Exp Neurol.* **156**:71-83.
- VESCOVI A, REYNOLDS B, FRASER D WEISS S. 1993. bFGF regulates the proliferative fate of unipotent (neuronal) and bipotent (neuronal/astroglial) EGF-generated CNS progenitor cells. *Neuron.* **11**: 951-966.

- _ Villa A, Snyder EY, Vescovi A. 2000. Establishment and properties of a growth factor-dependent, perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Exp Neurol*. **161**:67-84.
- VOLLRATH M, ATMANNBERGER M, WERBER K, OSBORN M. 1985. An ultrastructural and immunohistological study of the rat olfactory epithelium: unique properties of olfactory sensory cells. *Differentiation*. **29**:243-253.
- VOYRON S, GIACOBINI P, TAROZZO G, CAPPELLO P, PERROTEAU I, FASOLO A. 1999. Apoptosis in the development of the mouse olfactory epithelium. *Dev. Brain. Res.* **115**:49-55.

-W-

- WEBB J.F. and NODEN D.M. 1993. Ectodermal placodes: contributions to the development of the vertebrate head. *Amer Zool.* **33**:434-447.
- WEISS S, DUNNE C, HEWSON J, WOHL C, WHEATLEY M, PETERSON AC, REYNOLDS BA. 1996. Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci.* **16(23)**:7599-609.
- WERTHER GA, ABATE M, HOGG A, CHEESMAN H, OLDFIELD BJ, HARDS D, HUDSON P, POWER B, FREED K, HERINGTON AC. 1990. Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridisation. Relationship to IGF-I receptors. *Molec Endocr.* **4**:773-778.

-Y-

- YAMAGISHI M, HASEGAWA S, NAKANO Y, TAKAHASHI S, IWANAGA T. 1989. Immunohistochemical analysis of the olfactory mucosa by use of antibodies to brain proteins and cytokeratin. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **98**:384-388.
- YANDEVA BD, BILLINGHURST LL, SNYDER EY. 1999. "Global" cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: evidence from dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**:7029-7034.
- YAYON A, KALGSBURN M, ESKO J, LEDER P, ORNITZ D. 1991. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* **64**: 841-848.