La signalisation thyroïdienne promeut l'engagement des cellules souches neurales vers la différenciation

Sylvie Remaud, Ghislaine Morvan-Dubois, Barbara A. Demeneix

UMR CNRS 7221,
évolution des régulations endocriniennes,
département régulations, développement
et diversité moléculaire, Muséum National d'Histoire Naturelle,
7, rue Cuvier, 75231 Paris, Cedex 05, France.
bdem@mnhn.fr

➤ Dans le cerveau des mammifères adultes, deux régions neurogéniques majeures sont capables de fabriquer de nouvelles cellules neurales : la zone sous-granulaire au niveau du gyrus denté (hippocampe), et la zone sous-ventriculaire (ZSV) qui borde les parois des ventricules latéraux. Chez les rongeurs, les neurones nouvellement générés s'incorporent aux circuits neuronaux fonctionnels du cerveau tout au long de la vie. La niche neurogénique de la ZSV comprend trois types cellulaires majoritaires : les cellules souches neurales (CSN) qui se divisent lentement et donnent naissance à des cellules progénitrices à division rapide. Ces dernières sont à l'origine des neuroblastes (Figure 1). Chez la souris,

un grand nombre de neurones nouvellement formés migrent le long de la voie de migration rostrale (RMS) avant de s'intégrer aux réseaux d'interneurones présents au niveau du bulbe olfactif. De nombreux signaux extrinsèques et intrinsèques régulent les différentes phases de la neurogenèse [1]. En particulier, l'homéostasie de la niche dépend de signaux hormonaux, comme les hormones thyroïdiennes (HT), dont la forme biologiquement active est la T_3 . La T_3 exerce ses effets transcriptionnels par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires TR (*thyroid hormone receptor*). Plusieurs isoformes de TR ($TR\alpha$ et $TR\beta$) sont codées par deux gènes chez les vertébrés. Le $TR\alpha$, dont il existe deux isoformes

($TR\alpha1$ et $TR\alpha2$), est le plus fortement exprimé dans le cerveau, mais sa fonction reste mal définie. Les hormones thyroïdiennes sont connues pour être impliquées dans la prolifération et la différenciation des CSN et des progéniteurs, en particulier dans l'hippocampe [2]. Nous avons montré précédemment le rôle des hormones thyroïdiennes et de leur récepteur $TR\alpha1$ dans la prolifération au sein de la ZSV de souris adultes [3].

Plus récemment, nous avons montré que l'un des mécanismes d'action des hormones thyroïdiennes, *via* leur récepteur $TR\alpha1$, est de réguler la transition entre les progéniteurs et les neuroblastes [7]. La contribution de la signalisation thyroïdienne dans la

Figure 1. La signalisation thyroïdienne engage les progéniteurs vers la différenciation.

Vue sagittale d'un cerveau de souris adulte. La ZSV borde la paroi latérale du ventricule latéral. **A.** Trois types cellulaires principaux composent la ZSV : les cellules souches neurales (CSN) se renouvellent lentement et donnent naissance aux progéniteurs neuronaux à division rapide. Ceux-ci engendrent les neuroblastes qui migrent, *via* la voie de migration rostrale (RMS), vers le bulbe olfactif où ils se différencient en interneurones. Les niveaux d'expression de SOX2 et $TR\alpha1$ sont inversement corrélés : les cellules qui expriment fortement SOX2 n'expriment pas $TR\alpha1$ (CSN) ; les cellules qui expriment fortement $TR\alpha1$ expriment

de faibles niveaux de SOX2 (neuroblastes). Le ligand T_3 agit à la fois sur la prolifération et la différenciation des CSN et des progéniteurs [5, 9].

B. La surexpression de $TR\alpha1$ dans les CSN et les progéniteurs conduit (4 jours après la transfection) à la formation d'un groupe de neuroblastes qui coexpriment la GFP (*green fluorescent protein*, cellules vertes), à l'entrée de la voie RMS.

Figure 2. T₃ et TRα1 répriment la transcription de Sox2 dans la ZSV. La régulation de l'expression de Sox2 implique, entre autres, la séquence régulatrice SRR1, localisée dans sa région promotrice. Afin d'analyser le rôle fonctionnel de TRα1 et de son ligand dans la régulation de l'expression de Sox2, la séquence SRR1 a été clonée en amont d'un gène rapporteur Luciferase (Sox2-SRR1-Luc). Grâce à des expériences de transfert de gène *in vivo*, nous avons montré que l'activité transcriptionnelle de Sox2-SRR1-Luc est fortement diminuée en présence de T₃ (voir Sox2-SRR1-wild type ou Sox2-SRR1-wt). Notons que la même observation est obtenue quand le récepteur TRα1 est surexprimé, montrant que TRα1 et son ligand régulent négativement l'activité de SRR1. Enfin, la répression transcriptionnelle de SRR1, impliquant T₃, est abolie quand SRR1 est mutée par mutagenèse dirigée (voir Sox2-SRR1-muté), montrant l'importance fonctionnelle d'un site de fixation de TRα1 localisé dans SRR1, préalablement identifié par ChIP (technique d'immunoprécipitation de la chromatine). Ainsi, en présence de T₃, TRα1 interagit directement avec la séquence SRR1 de Sox2 et régule négativement son expression.

régulation de la balance entre les différents types cellulaires qui coexistent au sein de la ZSV a été étudiée *in vivo*. En effet, le microenvironnement conditionne la réponse des différents types cellulaires et la compréhension de l'homéostasie de la niche ne peut se faire qu'*in vivo* [4]. La ZSV de souris adulte se prête parfaitement à cette approche *in vivo*, et notamment au transfert de gènes non viral pour des approches de perte (vectorisation de siARN [small interfering RNA] [5]) et de gain de fonction (vectorisation de plasmides d'expression [3, 6]).

La signalisation thyroïdienne en aval de TRα1 et de son ligand engage les progéniteurs vers la différenciation neuronale

Le récepteur TRα1 est la seule isoforme des TR exprimée par les cellules de la ZSV de souris adultes [3]. Plus précisément, nous avons montré par immunofluorescence que, dans cette région, son expression est restreinte aux cellules progénitrices et aux neuroblastes [7]. L'absence de TRα1 dans les CSN et son émergence dans les progéniteurs nous ont fait émettre l'hypothèse selon laquelle l'engagement des CSN vers

ce récepteur. En accord avec cette hypothèse, la surexpression du récepteur TRα1 dans les CSN et les progéniteurs *via* le transfert de son gène *in vivo*, est suffisante pour induire la formation de neuroblastes migratoires qui quittent la ZSV pour s'engager le long du RMS (Figure 1). Inversement, l'extinction de TRα1 (*via* la vectorisation de siARN) entraîne une augmentation de l'expression de marqueurs des CSN et des progéniteurs, suggérant une augmentation du compartiment des CSN-progéniteurs dans la ZSV [7]. De plus, dans la ZSV de souris mutantes TRα^{0/0}, dépourvues de toutes les isoformes produites par le locus TRα, le nombre de CSN et de progéniteurs bloqués en interphase s'accumule [3]. La question s'est alors posée de savoir si le récepteur seul suffit à cette action, ou si la présence du ligand est également requise. Nous avons montré que le phénotype de blocage des cellules en interphase est également obtenu dans une situation d'hypothyroïdisme, c'est-à-dire lors d'une forte diminution de la quantité de T₃ disponible. Ainsi, l'absence de TRα1 ou de T₃ a les mêmes effets : l'augmentation des populations de CSN et de progéniteurs et la dimi-

nution du nombre de neuroblastes qui migrent le long du RMS [3, 7]. Ainsi, au cours de la neurogenèse adulte, la T₃ liée au TRα1 favorise, non seulement la prolifération des CSN et des progéniteurs, mais également leur différenciation en neuroblastes.

La signalisation thyroïdienne régule négativement l'expression de Sox2, un facteur clé de l'identité des cellules souches

Les réseaux de signaux intrinsèques responsables du maintien de la multipotentialité des cellules progénitrices sont finement régulés par quelques acteurs clés dont le gène Sox2. Dans la ZSV, la protéine SOX2 est présente majoritairement dans les CSN et les progéniteurs ; son expression décroît dans les neuroblastes [7, 8]. De plus, l'engagement des progéniteurs dans un processus de différenciation requiert la répression de Sox2, celle-ci favorisant l'expression de facteurs proneuraux [9]. Or, les facteurs qui régulent négativement l'expression de Sox2 demeurent peu connus. Nous nous sommes donc demandé si l'expression de Sox2 pouvait être modulée par la signalisation thyroïdienne au sein des cellules de la ZSV adulte. Nous avons observé par immunofluorescence que l'apparition de TRα1 dans les progéniteurs coïncide avec une diminution de

l'expression de *Sox2*. Des expériences de perte et de gain de TR α 1 par la technique de transfert de gènes *in vivo* nous ont permis de montrer que le récepteur TR α 1 induit la répression de *Sox2*, répression dans laquelle est également impliquée l'hormone T₃. Nous avons montré : (1) par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine *in vivo* et par mutagenèse dirigée que – en présence du ligand T₃ – TR α 1 s'associe avec une séquence régulatrice SRR1, présente dans la région promotrice de *Sox2* ; et (2) en utilisant un système rapporteur, que l'activité *enhancer* de SRR1 est diminuée en présence de T₃ (Figure 2). Selon notre modèle, la transition cellulaire du stade de progéniteur vers celui de neuroblaste serait renforcée par l'action de la signalisation thyroïdienne sur un autre gène, *cyclinD1*, impliqué quant à lui dans la progression du cycle cellulaire. En effet, par des approches de perte et de gain de fonction de TR α 1, nous avons montré que ce gène est également réprimé par la signalisation thyroïdienne [3, 5, 7], ce qui favoriserait ainsi la neurogenèse. En effet, des études récentes ont montré qu'une diminution de l'expression de *cyclinD1* est associée à une augmentation de la durée du cycle cellulaire, elle-même

corrélée à une augmentation de la neurogenèse [10]. Ainsi, la signalisation thyroïdienne contrôlerait l'homéostasie de la ZSV adulte à des niveaux multiples : (1) en réprimant directement le gène *Sox2*, un acteur clé de la multipotentialité des CSN et des progéniteurs ; et (2) en contrôlant la progression du cycle cellulaire des CSN et des progéniteurs via la répression d'un régulateur clé du cycle cellulaire, *cyclinD1*.

Ce travail constitue la première démonstration *in vivo* d'un rôle fondamental de la signalisation thyroïdienne en tant que régulateur de la neurogenèse. Notre étude montre que, dans les progéniteurs, la T₃ réprime l'expression de *Sox2*, un gène clé de l'identité des CSN. Il s'agit de la première démonstration d'une régulation négative de *Sox2*. Ce travail complète les études antérieures en révélant les bases moléculaires de la signalisation thyroïdienne qui montre que celle-ci régule en de multiples points les réseaux de gènes impliqués dans la neurogenèse. Il ouvre de nouvelles perspectives pour comprendre les dysfonctionnements neuraux associés à l'hypothyroïdie et l'hyperthyroïdie. ♦

Thyroid hormone signalling favors neural stem cell commitment

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Suh H, Deng W, Gage FH. Signaling in adult neurogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009 ; 25 : 253–75.
2. Desouza LA, Ladiwala U, Daniel SM, et al. Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci* 2005 ; 29 : 414–26.
3. Lemkine GF, Raj A, Alfama G, et al. Adult neural stem cell cycling *in vivo* requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J* 2005 ; 19 : 863–5.
4. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 2011 ; 8 : 486–98.
5. Hassani Z, Francois JC, Alfama G, et al. A hybrid CMV-H1 construct improves efficiency of PEI-delivered shRNA in the mouse brain. *Nucleic Acids Res* 2007 ; 35 : e65.
6. Lemkine GF, Mantero S, Migne C, et al. Preferential transfection of adult mouse neural stem cells and their immediate progeny *in vivo* with polyethylenimine. *Mol Cell Neurosci* 2002 ; 19 : 165–74.
7. Lopez-Juarez A, Remaud S, Hassani Z, et al. Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing *Sox2* in the adult neural stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2012 ; 10 : 531–43.
8. Bergsland M, Ramskold D, Zaouter C, et al. Sequentially acting *Sox* transcription factors in neural lineage development. *Genes Dev* 2011 ; 25 : 2453–64.
9. Favaro R, Valotta M, Ferri AL, et al. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require *Sox2*-dependent regulation of *Shh*. *Nat Neurosci* 2009 ; 12 : 1248–56.
10. Lange C, Huttner WB, Calegari F. Cdk4/cyclinD1 overexpression in neural stem cells shortens G1, delays neurogenesis, and promotes the generation and expansion of basal progenitors. *Cell Stem Cell* 2009 ; 5 : 320–31.

Hépatite B

Jean-Michel Pawlotsky
Daniel Dhumeaux

ISBN : 978-2-8425-4131-6 576 pages

Bon de commande

À retourner à EDK, 25, rue Daviel - 75013 Paris
Tél. : 01 58 10 19 05 - Fax : 01 43 29 32 62 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Hépatite B** : 54 € + 3 € de port = **57 € TTC** offre exceptionnelle réservée aux abonnés à m/s jusqu'au 31 décembre 2010

en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de **EDK**

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |