

## Un microARN régule la production de neurones dopaminergiques dans le cerveau antérieur

Antoine de Chevigny, Harold Cremer, Nathalie Coré

► Dans le cerveau des mammifères (homme compris), la production de neurones, ou neurogenèse, n'est pas un phénomène purement embryonnaire. En effet, elle est maintenue tout au long de la vie dans deux régions cérébrales : l'hippocampe et le système olfactif.

Au sein du système olfactif, différents types de neurones nouvellement générés vont s'intégrer aux réseaux neuronaux préexistants dans le bulbe olfactif, premier relais des entrées sensorielles olfactives. Cette neurogenèse continue repose sur la pérennité de cellules souches neurales (CSN) localisées sur les parois des ventricules latéraux au centre du cerveau. De façon intéressante, ces cellules souches ne représentent pas une population homogène, mais elles sont spécifiquement régionalisées le long des axes dorso-ventral et rostro-caudal. Ainsi, les cellules souches de la partie dorsale du ventricule génèrent préférentiellement des neurones qui utilisent le neurotransmetteur dopamine, tandis que les cellules souches ventrales et rostro-médianes donnent naissance, respectivement, à des neurones caractérisés par l'expression des protéines calbindine et calrétinine [1].

Dans un contexte thérapeutique, il est intéressant de noter que les neurones dopaminergiques du système olfactif présentent des caractéristiques similaires aux neurones dopaminergiques affectés dans la maladie de Parkinson. Ils sont donc des candidats potentiels pour un futur mode de remplacement cellulaire chez les patients parkinsoniens [2]. Il est donc capital de comprendre

pourquoi et comment une population spécifique de cellules souches neurales génère ce type de neurones. Les mécanismes moléculaires qui contrôlent cette régionalisation sont loin d'être élucidés. Cependant, il a été montré récemment que le morphogène *Sonic hedgehog* est impliqué dans ce processus et contrôle le devenir des cellules souches situées dans la partie ventrale de la paroi ventriculaire [3].

Une protéine clé pour la génération des neurones dopaminergiques du cerveau antérieur est le facteur de transcription *Pax6* (*paired box 6*) [4, 5]. De plus, il a été montré que l'action de ce facteur est clairement dépendante de sa concentration, notamment dans sa fonction de déterminant dopaminergique [6]. Il doit donc nécessairement exister des mécanismes qui régulent finement l'expression de cette protéine dans les cellules.

### Régulation post-transcriptionnelle de *Pax6* dans les cellules souches neurales

En examinant avec précision l'expression de *Pax6*, nous avons observé que la protéine est distribuée selon un gradient dorso-ventral, avec une forte expression dans la région dorsale et une expression très faible dans la région latérale de la paroi ventriculaire (Figure 1). Ceci est en accord avec le fait que les neurones dopaminergiques sont essentiellement issus de la région dorsale [1]. En revanche, de manière surprenante, nous avons trouvé que l'ARN messager (ARNm) de *Pax6* est exprimé beaucoup plus largement, puisqu'il est détecté jusque

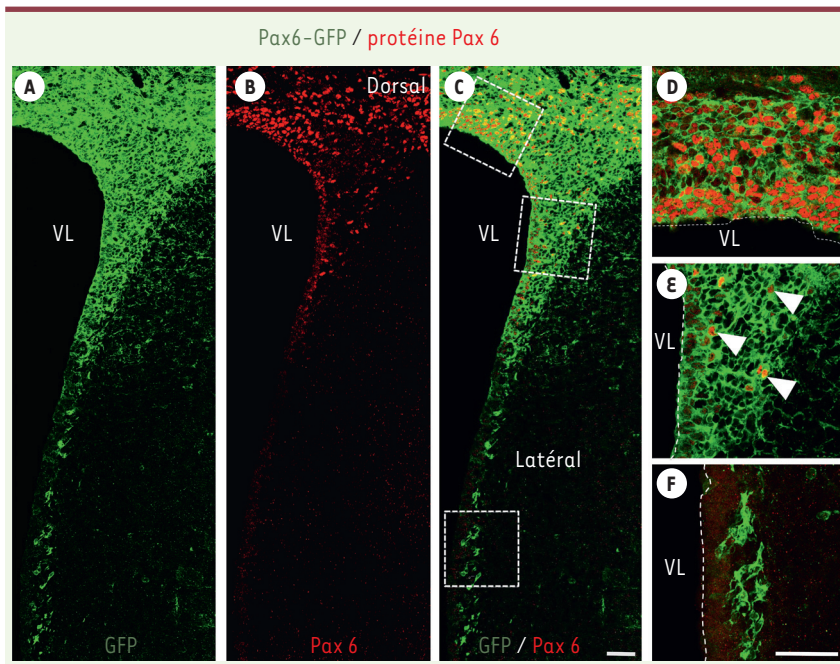
Institut de biologie du développement de Marseille-Luminy (IBDML), CNRS UMR 7288, campus de Luminy, 13288 Marseille Cedex 9, France ; Université Aix-Marseille, 13009 Marseille, France.  
harold.cremer@univmed.fr

dans les régions les plus ventrales de la paroi ventriculaire latérale (Figure 1). Cela indique qu'il existe une inhibition post-transcriptionnelle du gène *Pax6* dans la paroi ventriculaire latérale, de façon à restreindre la présence de *Pax6* à la région dorsale, afin de réguler finement la quantité de neurones dopaminergiques produite. Les séquences non traduites en protéine des ARNm (UTR, *untranslated region*) renferment les sites cibles privilégiés de ces mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. C'est pourquoi nous avons testé si l'absence de la région 3'-UTR (l'UTR en aval de la séquence codante, le plus souvent impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle) de *Pax6* était suffisante pour que l'expression de la protéine soit induite dans la paroi latérale. Pour cela, nous avons introduit la séquence codante pour l'ARNm de *Pax6* en présence ou non de la séquence 3'-UTR dans les cellules souches neurales de la paroi latérale en utilisant une stratégie d'électroporation post-natale des ventricules [7]. Seule l'électroporation avec la séquence *Pax6* dépourvue de 3'-UTR permettait d'induire l'expression de la protéine dans ces cellules, alors que le gène *Pax6* entier était réprimé, démontrant ainsi qu'il existe une inhibition post-transcriptionnelle de *Pax6* via son 3'-UTR.

### Identification du microARN miR-7a comme régulateur potentiel de la distribution dorso-ventrale de *Pax6*

Les microARN sont des petits ARN non codants de 21 à 25 nucléotides





**Figure 1. Expression différentielle de la protéine Pax6 et de son transcrite le long des parois ventriculaires du cerveau.** Une section de cerveau de souris transgénique, exprimant la GFP (*green fluorescent protein*) sous le contrôle du promoteur de *Pax6*, a été marquée avec des anticorps dirigés contre la GFP (A) (vert, qui mime donc l'expression du transcrite *Pax6*) et contre la protéine Pax6 (B) (rouge). À droite, un grossissement des parties dorsale (C, D), dorso-latérale (C, E) et ventro-latérale (C, F) montre que Pax6 et la GFP colocalisent dans la plupart des cellules dorsales, alors que Pax6 n'est détectée que dans une petite population de cellules GFP<sup>+</sup> dans la région dorso-latérale (E) (têtes de flèches). Les cellules exprimant la GFP dans la partie ventrale ne sont jamais positives pour la protéine Pax6. VL : ventricule latéral.

qui contrôlent l'activité post-transcriptionnelle des gènes et inhibent leur expression en bloquant la traduction des ARNm. Les microARN reconnaissent de courtes séquences spécifiques dans la partie 3'-UTR des ARNm en s'hybridant à une région complémentaire de six à huit nucléotides [8, 9]. Pour cette raison nous avons cherché des microARN potentiellement capables de se fixer au 3'-UTR de *Pax6* en utilisant des algorithmes de prédiction de cibles des microARN. En croisant plusieurs bases de données, nous avons isolé cinq microARN candidats, largement conservés entre les espèces animales. Nous avons ensuite testé, *in vitro*, en utilisant le système rapporteur luciférase, leur capacité à inhiber l'expression d'un gène lorsque celui-ci est couplé au 3'-UTR de *Pax6*. Trois de ces cinq microARN diminuaient

significativement l'expression du gène rapporteur et représentaient donc des candidats possibles pour inhiber *Pax6* dans les cellules souches neurales de la paroi latérale. En nous focalisant sur ces trois microARN, nous avons déterminé leur expression dans les parois du ventricule latéral à la recherche d'un ou plusieurs candidat(s) enrichi(s) dans la paroi latérale où l'inhibition de l'expression de *Pax6* a lieu dans les conditions physiologiques. Pour cela, nous avons d'abord mesuré par *deep sequencing* (une méthode quantitative de séquençage à haut débit) les niveaux d'expression des différents microARN dans les parois ventriculaires dorsale et latérale préalablement isolées par microdissection. Cette approche a montré qu'un seul des trois microARN candidats, miR-7a, est à la fois fortement exprimé dans la

paroi latérale et quasiment absent de la paroi dorsale. De plus, une dissection plus fine de la paroi ventriculaire a démontré que l'expression de miR-7a suit un gradient ventro-dorsal qui est opposé à celui de *Pax6*. miR-7a pouvait donc être à l'origine du gradient de protéine *Pax6* dans la paroi ventriculaire.

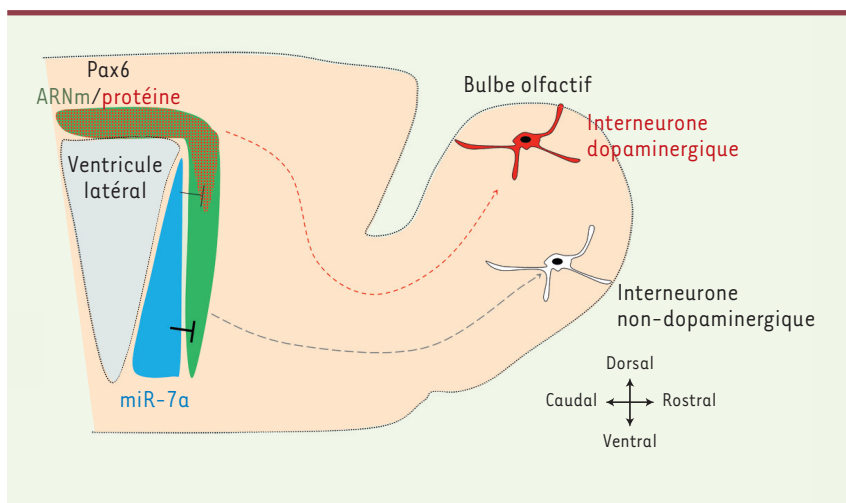
### Lien fonctionnel entre miR-7a et Pax6

Comment démontrer que miR-7a régule bien l'expression de *Pax6* dans les cellules souches neurales des parois ventriculaires latérales du cerveau ? Nous avons d'abord établi qu'une mutation de seulement deux nucléotides du 3'-UTR de *Pax6* dans la région de fixation de miR-7a était suffisante pour rétablir l'expression de la protéine *Pax6* dans la paroi latérale du ventricule. Ensuite, nous avons montré que l'expression forcée de miR-7a dans la paroi dorsale était suffisante pour diminuer l'expression de la protéine *Pax6* endogène. Inversement, l'inhibition de miR-7a endogène par électroporation des cellules souches neurales de la paroi latérale avec un « vecteur éponge à miR-7a » capable de titrer le microARN induisait l'apparition de la protéine *Pax6* dans ces cellules<sup>1</sup>.

### Rôle de miR-7a dans la production des neurones dopaminergiques bulbaires

Finalement, la question cruciale qui restait en suspens était de déterminer si l'inhibition de miR-7a dans les cellules souches neurales de la paroi latérale pouvait changer le destin de ces cellules progénitrices, en leur permettant de générer plus de neurones dopaminergiques *via* l'induction de *Pax6*. Nous avons donc inhibé miR-7a dans les cellules souches neurales latérales, puis sacrifié les souris 15 jours après pour laisser le temps à leur descendance d'atteindre le bulbe olfactif et de se différencier. Nous

<sup>1</sup> L'éponge à miR-7a est un vecteur codant pour un ARN artificiel contenant plusieurs répétitions en tandem de la séquence cible de miR-7a, ce qui permet de séquestrer ce microARN et donc d'inhiber son action sur les ARN messagers cibles endogènes.



**Figure 2. Modèle de régulation de Pax6 par miR-7a dans la paroi ventriculaire.** La présence de miR-7a selon un gradient ventro-dorsal dans la paroi latérale du ventricule génère un gradient opposé d'expression de la protéine Pax6 par inhibition post-transcriptionnelle, limitant ainsi la production de neurones dopaminergiques dans le bulbe olfactif à partir des progéniteurs latéraux. À l'inverse, l'absence de miR-7a dans la région dorsale prévient l'inhibition de l'expression de Pax6, permettant ainsi la production de neurones dopaminergiques.

avons ensuite analysé les populations neuronales générées et montré que la population de neurones dopaminergiques était significativement augmentée. Ainsi miR-7a est bien impliqué dans la régionalisation des cellules souches neurales en inhibant l'expression de la protéine Pax6 dans les cellules de la paroi latérale, et ce dans le but de contrôler le nombre de neurones dopaminergiques générés dans le bulbe olfactif (Figure 2).

### Conclusion

Nous avons montré qu'un microARN, miR-7a, limite la genèse de neurones dopaminergiques dans le bulbe olfactif post-natal en inhibant l'expression de la protéine Pax6 dans les précurseurs neuronaux des parois ventriculaires latérales [10]. Ce résultat nouveau ajoute un niveau de complexité à la régulation moléculaire de la destinée neuronale dans le cerveau adulte. Ce résultat peut avoir des retombées thérapeutiques dans le domaine du remplacement cellulaire, notamment dans le cadre des maladies neurodégénératives. À cet égard, il a récemment été montré que des fibroblastes humains peuvent être directement convertis en neurones par le simple

ajout de deux microARN [11]. Notre découverte permet d'envisager l'utilisation exclusive de microARN pour la genèse de types neuronaux particuliers.

Il est intéressant de noter que dans la maladie de Parkinson, non seulement les neurones dopaminergiques olfactifs ne dégèrent pas, mais leur nombre augmente [12, 13]. De plus, chez des souris parkinsoniennes, la seule infusion d'un facteur de croissance, le *transforming growth factor  $\alpha$*  (TGFA), suffit à recruter massivement les cellules souches des parois ventriculaires vers le striatum dépourvu de dopamine [14]. Il est donc permis d'imaginer utiliser ces découvertes sur Pax6 et miR-7a pour induire, après recrutement dans le striatum, la différenciation de ces cellules souches neurales en neurones dopaminergiques, avec l'espoir que cette approche thérapeutique pourra améliorer le comportement locomoteur des souris malades. ♦

### Micro-RNA miR-7a controls the production of dopaminergic neurons in the mouse forebrain

#### LIENS D'INTÉRÊT

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

## RÉFÉRENCES

1. Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 2007 ; 317 : 381-4.
2. Lie DC, Song H, Colamarino SA, et al. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 2004 ; 44 : 399-421.
3. Ihrie RA, Shah JK, Harwell CC, et al. Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron* 2011 ; 71 : 250-62.
4. Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, et al. Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat Neurosci* 2005 ; 8 : 865-72.
5. Kohwi M, Osumi N, Rubenstein JL, Alvarez-Buylla A. Pax6 is required for making specific subpopulations of granule and periglomerular neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 2005 ; 25 : 6997-7003.
6. Dellovade TL, Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M. Olfactory bulb development is altered in small-eye (Sey) mice. *J Comp Neurol* 1998 ; 402 : 402-18.
7. Boutin C, Diestel S, Desoeuvre A, et al. Efficient *in vivo* electroporation of the postnatal rodent forebrain. *PLoS One* 2008 ; 3 : e1883.
8. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008 ; 9 : 102-14.
9. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE* 2007 ; 2007 : re1.
10. De Chevigny A, Core N, Follert P, et al. miR-7a regulation of Pax6 controls spatial origin of forebrain dopaminergic neurons. *Nat Neurosci* 2012 ; 15 : 1120-6.
11. Yoo AS, Sun AX, Li L, et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 2011 ; 476 : 228-31.
12. Winner B, Geyer M, Couillard-Despres S, et al. Striatal deafferentation increases dopaminergic neurogenesis in the adult olfactory bulb. *Exp Neurol* 2006 ; 197 : 113-21.
13. Huisman E, Uylings HB, Hoogland PV. A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2004 ; 19 : 687-92.
14. De Chevigny A, Cooper O, Vinueza A, et al. Fate mapping and lineage analyses demonstrate the production of a large number of striatal neuroblasts after transforming growth factor alpha and noggin striatal infusions into the dopamine-depleted striatum. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008 ; 26 : 2349-60.