



**HAL**  
open science

# FONCTIONS DU FACTEUR HSF2 EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET AU COURS DU STRESS ALCOOLIQUE

Myriame Mohamed

► **To cite this version:**

Myriame Mohamed. FONCTIONS DU FACTEUR HSF2 EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET AU COURS DU STRESS ALCOOLIQUE. Sciences du Vivant [q-bio]. 2018. hal-01998631

**HAL Id: hal-01998631**

**<https://ephe.hal.science/hal-01998631>**

Submitted on 30 Jan 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique  
des Hautes Études



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES  
Sciences de la Vie et de la Terre

Mémoire

Présenté par

**Mohamed Myriame**

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**FONCTIONS DU FACTEUR HSF2 EN CONDITIONS  
PHYSIOLOGIQUES ET AU COURS DU STRESS ALCOOLIQUE**

Soutenu le 13 septembre 2018 devant le jury suivant :

**Dr Michèle Chabert**

Présidente

**Dr Jeannette Nardelli**

Rapportrice

**Dr Laurence Goutebroze**

Examinatrice

**Dr Flore Renaud-Païtra**

Tutrice pédagogique

**Dr Délara Sabéran-Djoneidi**

Tutrice scientifique

**Dr Véronique Dubreuil**

Examinatrice (co-tutrice scientifique)

Mémoire préparé sous la direction de :

**Délara Sabéran-Djoneidi et Véronique Dubreuil**

UMR 7216 Centre épigénétique et destin cellulaire

Université Paris Diderot

Equipe : Interface entre développement et environnement

Et de

**Flore Renaud-Païtra**

Institut Gustave Roussy

UMR INSERM Univ. Paris-Sud EPHE U1186

Groupe « Génétique Oncologique EPHE »

*A mes Parents Ali et Fatouma*

*A mon Frère Yasser, et mes Sœurs, Sabrina, et Faïda*

*Un message pour mes Rayons de soleil d'aujourd'hui, Hana et Jade, et pour ceux à venir*

« ... Aussi haut que nous nous élancions, c'est toujours de nos racines que nous puisons notre force. »

*Extrait de « Celle qui plante les arbres »*

Wangari Muta Maathai

*(Professeure biologiste - Prix Nobel de la paix 2004)*

## **Remerciements**

*Le travail d'écriture m'a fait réaliser à quel point j'ai eu plaisir d'apprendre, et à quel point j'ai été formidablement soutenue. Loin d'être une formalité de début de mémoire, cela me tient vraiment à cœur de vous exprimer ma gratitude.*

*Je remercie les membres du jury, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail, la présidente Michèle Chabert, mais aussi Laurence Goutebroze (examinatrice), et Jeannette Nardelli qui a accepté d'être rapportrice. Merci pour le temps que vous y accordez, et j'espère qu'il vous plaira autant de le lire, qu'il m'a plu de l'écrire.*

*Je souhaite tout particulièrement remercier Madame Flore Renaud-Paitra d'avoir accepté d'être la tutrice pédagogique de ma formation. Je vous remercie de vous être impliquée dans mon encadrement, par vos conseils, et votre disponibilité.*

*Tout d'abord, merci à Damien Neuillet, qui m'a suggéré de m'inscrire à l'EPHE, ce qui m'a permis de me diriger vers le bon parcours. Merci aussi pour ta bonne humeur, et les pépites du web que tu nous as fait découvrir. Que de bons souvenirs !*

*Jonathan et Valérie, je vous remercie infiniment de m'avoir fait confiance, et de m'avoir permis de rejoindre cette belle aventure. Merci d'avoir toujours soutenu et encouragé ma formation, en croyant en ce que je faisais. La confiance que vous m'accordez est une source de motivation.*

*Jonathan, merci pour le soutien bienveillant que tu me portes, et pour tes conseils avisés. Ton soutien me touche beaucoup.*

*Valérie, je tiens tout particulièrement à t'exprimer ma gratitude, parce qu'en plus de m'avoir accueillie dans l'unité, tu m'as fait une place dans ton équipe. Je ne saurais te dire à quel point ton soutien m'est précieux. Tu pousses ceux qui t'entourent à révéler leurs propres potentiels. Merci aussi pour ta joie de vivre et pour ta sincérité !*

*Je remercie également les chefs d'équipe de l'unité, qui ont encouragé ma formation dès mon recrutement dans l'unité, et qui n'ont eu de cesse de le faire durant ces années.*

*Merci particulièrement à Claire Francastel et son équipe pour le temps accordé, et plus particulièrement merci à Guillaume Velasco.*

*Merci à Slimane Ait-Si-Ali pour sa disponibilité et ses recommandations. Merci Slimane pour tes encouragements, et les petites discussions sympas quand je passe d'un pas de velours avec mon chariot près du bureau.*

*Merci à Claire Rougeulle de m'avoir accueillie dans son bureau. J'y ai grandi professionnellement, et j'y ai construit des amitiés inestimables. Merci Claire pour ces moments de partage avec ton équipe et toi.*

*Merci à ton équipe qui m'a chaleureusement accueillie. Les membres passés et présents, Céline Vallot, Tarvesh, Giulia, Céline Morey, Olga, Louis avec qui j'aime plaisanter, et Madeleine qui me fait le plaisir de partager le tatami pour vivre une passion commune.*

*Miguel, meu preferido, meu ouvinte, si on n'avait pas partagé un bureau, on n'aurait surement pas su qu'on pouvait partager une belle amitié. On aurait aussi probablement économisé beaucoup de post-it, mais tu sais qu'ils ont tous été marqués avec sincérité. Merci pour ces longues discussions, et pour tes conseils, ils me sont précieux. N'oublie pas mes petits mots « mais do que ontem... every day is a new chance... »*

*Merci à Jean-François et Christophe, des supers associés qui m'ont été si souvent d'un secours précieux.*

*Jean-François, merci de tout ton aide... du coup de main pour des réparations, au trafic de flutes de champagne... Chuuut !!! c'est toujours notre petit secret. Merci de mettre cette bonne ambiance dans la vie du labo, dans nos sorties, et nos sessions footing (avec ou sans option mini short). C'est toujours bien mieux quand tu es de la partie !*

*Christophe, tu as toujours pris mon parti pour défendre mon travail, le valoriser, et pour m'appuyer. Je t'en suis très reconnaissante. Ce soutien m'a conforté dans ma démarche, merci à toi.*

*J'ai eu le plaisir d'être scientifiquement encadrée par Délara Sabéran-Djoneidi et Véronique Dubreuil. Merci à vous deux pour votre considérable investissement dans ma formation. Vous m'avez accompagnée, et soutenue avec bienveillance, et patience.*

*Véronique, merci de m'avoir fait profiter de ton immense savoir, en me formant, tout en me laissant l'espace suffisant pour que je gagne en confiance. C'est aussi un grand plaisir de pouvoir échanger et plaisanter entre deux manips. Merci pour ta bonne humeur, et ta gentillesse qui rendent ce travail encore plus motivant.*

*Délara, je suis profondément reconnaissante de ton aide durant ces années, aussi bien sur le plan professionnel, que personnel. J'ai eu la chance de bénéficier de ton enseignement. Je suis extrêmement touchée par ton investissement et ton engagement pour me former, et me soutenir à tous niveaux. Merci de tant donner avec générosité et passion.*

*Merci au membres passés et présents de l'équipe de Valérie. Anne-Laure, et Renaud, merci de m'avoir accordé de votre temps pour me former. Je garde un agréable souvenir de ces heures de travail abattues, avec l'enthousiasme d'apprendre.*

*Merci à Aurélie, et Anne, pour votre implication dans cette aventure. Merci Agathe, co-équipière des manips, des pistes de ski, et « des socials events games ». J'apprécie énormément les temps de travail, et de loisirs que je passe avec vous. Merci à vous toutes de m'avoir accompagnée dans ma progression.*

*Merci à l'équipe de Michèle Darmon au CPN (centre de psychiatrie et neurosciences), avec qui j'ai eu plaisir de collaborer. Merci particulièrement à Jorge Diaz de s'être investi dans ma formation sur les techniques de marquages de neurones. Merci aussi à David Geny pour son aide en microscopie, et pour les logiciels d'analyse de neurones.*

*Merci à Mélanie, Damien, Andrew, et Sandra. L'équipe de choc ! Un peu dingue ! Juste un peu... Que de moments inoubliables. Vous avez contribué à la naissance de l'unité, et vous*

*m'avez beaucoup inspirée dans la poursuite de ce diplôme. Vos moments de joies, de doutes, et aussi de réussites partagées ensemble ont probablement contribué à mon envie d'aller plus loin.*

*Ma Sandrineeeeeette (voix très aigüe) !! Merci pour cette belle amitié... évidente, sincère, facile, car on se retrouve en beaucoup de points. Toujours de bons conseils, tu m'as toujours encouragée. Cela me va droit au cœur, et tu sais que tu y as une place particulière.*

*Merci à tous les membres de l'unité, qui ont appuyé ce projet par leurs soutiens et leurs patiences. Merci particulièrement à Geneviève, Xavier, et Ingrid qui sont des alliés précieux pour tout ce que nous réalisons.*

*Merci à Anne, Martine, et Fabienne pour vos encouragements et votre accompagnement. Vous avez joué un rôle majeur dans cette formation en me transmettant vos savoir-faire. Cela m'a énormément apporté.*

*Merci tout particulièrement à ma biscotte Laure, si craquante. Merci d'être présente, et d'avoir toujours été celle sur qui je pouvais compter au labo et hors labo. Merci pour cette jolie complicité, et pour ton soutien. Cela signifie beaucoup à mes yeux.*

*Merci infiniment à Norry, qui depuis l'Institut Jacques Monod, et même depuis les caraïbes, me propose toujours un coup de main, et toujours de bon cœur. Un grand merci pour ton soutien que je considère comme un réel privilège.*

*Un énorme merci à mes familles. Ma famille de cœur, Reasey et Vanessa, car construire une amitié depuis si longtemps, c'est se construire une famille. Vous avez été des alliées formidables. Quel plaisir de vivre ces challenges avec vous !*

*Yvens, je ne pourrais jamais assez te remercier pour tout ce que tu fais depuis toujours. Tu es toujours présent, et tu trouves des solutions magiques à tout. Merci de m'avoir soutenue pour cette étape importante. Tu comptes énormément !*

*Merci à mes cousines Kalth, et Karina, et aussi merci à la famille, Guy, Hermann, Inès d'avoir suivi cette saga. Merci pour toutes les réunions de famille improvisées de fin de repas... réunions complètement folles !! Pas toujours fructueuses pour les réflexions, mais toujours excellentes pour le moral.*

*Merci à toi Saïd-Salim de me donner le sentiment que tout est possible. Merci de m'accompagner et de croire en moi. Ton courage et ta détermination m'inspire énormément. Merci d'être aussi attentif et présent, j'ai beaucoup de chance.*

*Enfin, merci à mes frères et sœurs, et mes parents. Sabrina, Faïda, et Yasser, notre petit groupe soudé est une force pour moi, merci à vous ! Merci à mes parents d'être une source d'inspiration par leur force et leur courage. Vous m'avez appris à être solide. Merci de m'avoir aidée à relever ce défi, vous me donnez foi en moi.*

# Table des matières

---

## Table des matières

<b>Table des matières.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations.....</b>	<b>4</b>
<b>Préambule.....</b>	<b>6</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>8</b>
I. <i>Développement du cerveau murin.....</i>	<i>8</i>
1. Du zygote à la neurulation.....	8
2. Migration neuronale et formation des couches corticales.....	9
3. Fonctions de structures d'intérêt du cerveau dans notre étude.....	10
II. <i>Destin cellulaire au cours du développement : mécanismes épigénétiques.....</i>	<i>11</i>
1. Différenciation des cellules souches embryonnaires.....	11
2. Les modifications épigénétiques.....	11
3. Les ADNs méthyltransférases : <i>DNA methyltransferase</i> , DNMT.....	12
III. <i>Effet du stress sur le développement du cerveau : syndrome d'alcoolisation fœtale, SAF.....</i>	<i>13</i>
IV. <i>Les facteurs de transcription HSF, Heat Shock factors, médiateurs dans le stress.....</i>	<i>14</i>
1. Les facteurs de réponse au stress cellulaire.....	14
2. Mode d'action des HSFs.....	15
V. <i>HSF2 est nécessaire dans le développement du cerveau embryonnaire.....</i>	<i>15</i>
1. Rôle de HSF2 dans la migration neurale.....	15
2. Les cibles embryonnaires de HSF2.....	16
VI. <i>HSF2 médiateur majeur de défauts développementaux en réponse au stress alcoolique.....</i>	<i>17</i>
VII. <i>Projet de recherche :.....</i>	<i>18</i>
<b>Chapitre I - Fonctions du facteur HSF2 dans le cortex cérébral au cours du développement en réponse au stress alcoolique.....</b>	<b>20</b>
Introduction.....	20
I. <i>Les partenaires de HSF2 dans la réponse au stress.....</i>	<i>20</i>
II. <i>HSF2 est-il impliqué dans le profil de méthylation du génome en réponse au stress alcoolique ?.....</i>	<i>21</i>
Matériels et Méthodes.....	24
I. <i>Modèle animal embryonnaire.....</i>	<i>24</i>
II. <i>Injection des souris : protocole d'alcoolisation aiguë.....</i>	<i>24</i>
III. <i>Expérience d'Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....</i>	<i>24</i>
IV. <i>Définir les témoins expérimentaux.....</i>	<i>26</i>
V. <i>Dissection des cerveaux de souris embryonnaire E16, 5 et préparation des tissus.....</i>	<i>27</i>
VI. <i>Protocole de fragmentation de l'ADN par ultrason.....</i>	<i>28</i>
VII. <i>Conditions de l'immunoprécipitations de la chromatine.....</i>	<i>29</i>
Résultats.....	31
I. <i>Profil de sonication.....</i>	<i>31</i>
II. <i>Conditions de lyse.....</i>	<i>33</i>
III. <i>Immunoprécipitation avec les anticorps anti-HSF2 et anti-DNMT3A.....</i>	<i>34</i>
Conclusions et discussions.....	36

<b>Chapitre II - Caractérisation des défauts morphologiques et neuronaux du mutant HSF2 adulte en conditions physiologiques</b> .....	<b>38</b>
<i>Introduction</i> .....	38
I. <i>Rôle majeur du facteur HSF2 dans le cerveau embryonnaire</i> .....	38
II. <i>Expression et rôle du facteur HSF2 chez l'adulte</i> .....	39
III. <i>Effet de l'absence de HSF2 sur le comportement d'addiction</i> .....	40
IV. <i>Caractérisation morphologiques et cellulaires du cerveau murin adulte en absence de HSF2</i> 43	43
<i>Matériels et Méthodes</i> .....	43
I. <i>Modèle animal adulte</i> .....	43
II. <i>Analyse histologique des coupes marquées au Crésyl violet</i> .....	43
1. <i>Perfusion et dissection des cerveaux adultes de souris</i> .....	43
2. <i>Coupes flottantes des cerveaux adultes</i> .....	44
3. <i>Marquage des coupes au crésyl violet</i> .....	45
4. <i>Analyse des structures des cerveaux WT et KO</i> .....	46
III. <i>Analyse de marqueurs de couches spécifiques</i> .....	47
1. <i>Préparation des tissus et des coupes de cerveaux adultes</i> .....	47
2. <i>Hybridation <i>in-situ</i> sur lames</i> .....	48
3. <i>Hybridation <i>in-situ</i> en coupes flottantes</i> .....	50
4. <i>Méthode d'analyse de marqueurs spécifiques de couches</i> .....	51
IV. <i>Analyse morphologique et quantitative des épines dendritiques</i> .....	51
1. <i>Méthode de la DiOlistique pour le marquage des neurones au DiI</i> .....	51
2. <i>Préparation des billes de tungstène couplées au colorant DiI</i> .....	52
3. <i>Perfusion et dissection des cerveaux adultes de souris</i> .....	53
4. <i>Coupes au vibratome</i> .....	53
5. <i>Marquage des coupes au DiI</i> .....	53
6. <i>Microscopie confocale</i> .....	54
7. <i>Quantification des épines dendritiques</i> .....	55
<i>Résultats</i> .....	56
I. <i>Altérations morphologiques induites par l'absence du facteur HSF2 dans le cerveau adulte</i> 56	56
1. <i>Altération de la surface des coupes en absence du facteur HSF2</i> .....	56
1.1 <i>Réduction de la surface de la région antérieure du cerveau en absence de HSF2</i> ... 56	56
1.2 <i>Réduction de la surface des structures des coupes antérieures en absence de HSF2</i> . 57	57
1.3 <i>La réduction de la surface du thalamus en absence de HSF2, contribue à l'affinement du cerveau en partie antérieure</i> .....	58
2. <i>L'absence de HSF2 désorganise les couches corticales sans altérer l'épaisseur de l'ensemble des couches</i> .....	59
3. <i>L'absence du facteur HSF2 n'altère pas la surface de l'hippocampe et des ventricules</i> 60	60
4. <i>L'absence du facteur HSF2 n'altère pas la surface du striatum et des ventricules latéraux</i> .....	61
5. <i>Désorganisation de sous-régions du diencephale : thalamus et hypothalamus</i> .....	62
II. <i>Altérations dendritiques induites par l'absence du facteur HSF2 dans le cerveau adulte</i> .....	62
1. <i>L'absence de HSF2 favorise des malformations structurelles des dendrites</i> .....	62
2. <i>La densité des épines dendritiques diminue en absence de HSF2</i> .....	64
III. <i>Implication du facteur HSF2 sur la population neuronale dans le cerveau de souris adulte</i> . 65	65
1. <i>Mise au point du protocole d'Hybridation <i>in situ</i> sur coupes flottantes</i> .....	65
<i>Conclusions et discussions</i> .....	70
<b>Discussion générale</b> .....	<b>72</b>
Conditions expérimentales de ChIP-seq visant à identifier les cibles moléculaires des facteurs HSF2 et DNMT3A.....	72

Défauts morphologiques du cerveau en absence du facteur HSF2 : origine développementale ou altérations chez l'adulte ? .....	75
Significativité et variabilité des résultats expérimentaux.....	77
Particularité du fond génétique C57BL/6N.....	78
L'absence de HSF2 est responsable de la diminution de la densité des épines dendritiques et perturbe le fonctionnement neuronal : .....	79
La perte d'expression du facteur HSF2 est-elle impliquée dans des neuropathologies ?.....	81
Conclusion : .....	81
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>83</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>92</b>
Annexe 1 : Construction du modèle murin Knock-Out Hsf2.....	92
Annexe 2 : Protocole d'Hybridation In Situ sur lames.....	93
Annexe 3 : Protocole d'hybridation in situ sur coupes flottantes.....	95
<b>Résumé.....</b>	<b>97</b>

# Liste des abréviations

---

CC: Corps Caleux  
ChIP-Seq: *Chromatine Immunoprecipitation with Sequencing*  
CBP: *CREB binding protein*  
CP: *Cortical Plate*  
Cx: Cortex  
DNMT: ADN méthyltransférase  
EDTA: éthylène-diamine-tétra-acétique acide  
EPA : exposition prénatale à l'éthanol  
HAT: Histone acetyltransferase  
HDAC: Histone désacétylase  
H: Hippocampe  
HIS: Hybridation *In-Situ*  
HSE: *Heat Shock element*  
HSF: *Heat shock factor*  
HSP: *Heat shock protein*  
HSR: *Heat shock response*  
Hy: Hypothalamus  
IZ: *Intermediate Zone*  
KO: *Knock Out*  
LV: *Lateral Ventricule*  
MABT: *Maleic acid buffer*  
MAP gene : *Microtubule associated protein gene*  
MCI : Masse cellulaire interne  
MZ: *Marginal Zone*  
Nac: Noyau accumbens  
PCR: *Polymerase chain reaction*  
PFC: pre-frontal cortex  
PIC: *protein inhibitor cocktail*  
PP: Pré-plaque  
SP: Sous Plaque  
SRT: Syndrome de Rubinstein-Taybi

St: Striatum

SVZ: *Sub ventricular zone*

Th: Thalamus

VZ: *Ventricular zone*

WT: *Wild Type*

# Préambule

---

La thématique qui regroupe les équipes de l'UMR 7216, « le Centre épigénétique et destin cellulaire » est l'élucidation du lien entre l'environnement et les régulations de l'expression des gènes. Il s'agit de mettre en évidence le rôle et les mécanismes de mise en place, et de maintien de modifications épigénétiques. Ces mécanismes déterminent la plasticité et le destin cellulaire.

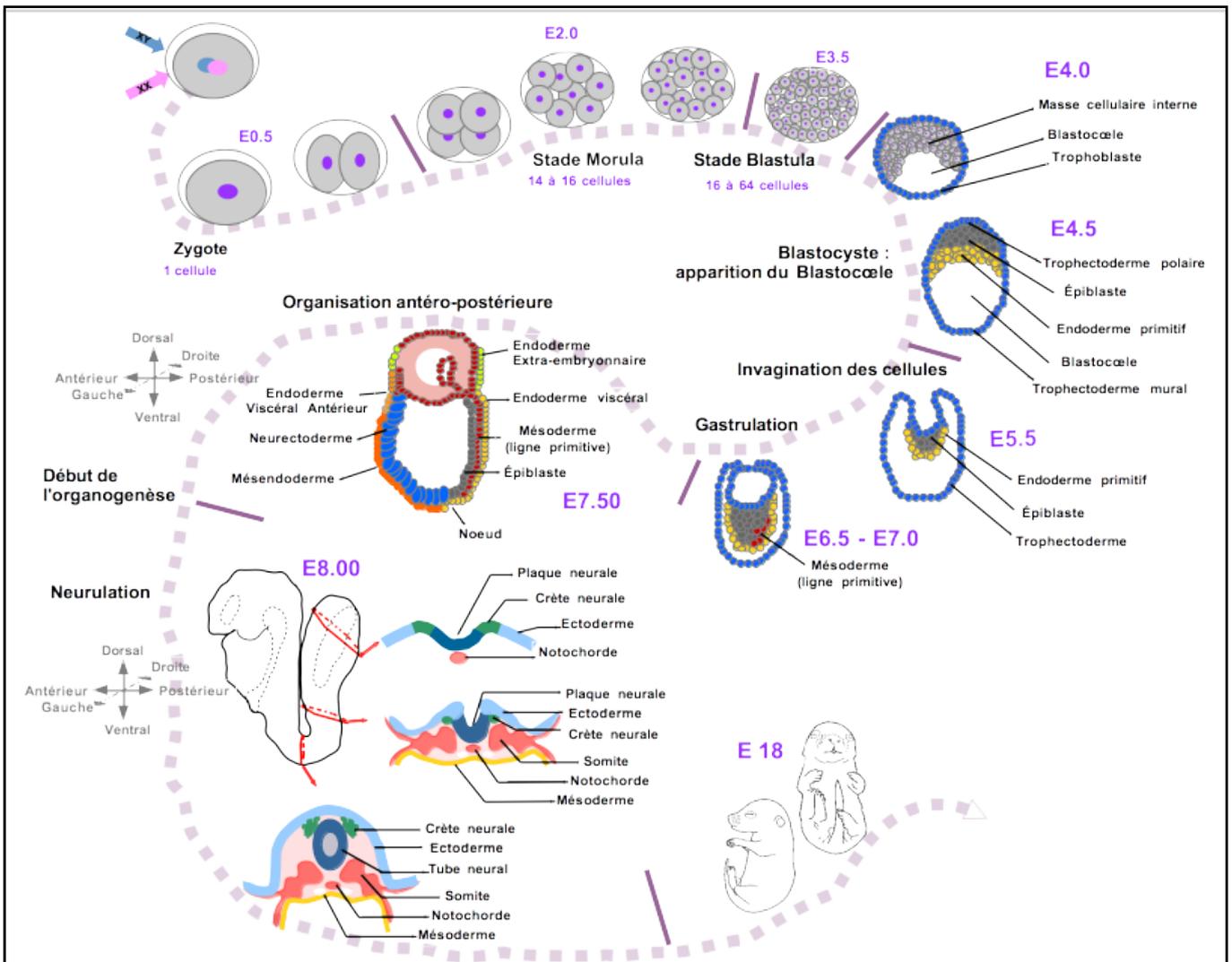
Mes travaux visaient initialement à caractériser les profils d'expression, dans le cerveau, de souris *Knock Out (KO)* pour divers acteurs épigénétiques, par la technique d'hybridation *in situ* (HIS). L'idée étant de pouvoir comparer, au cours du développement et chez l'adulte, les profils d'expression de gènes impliqués dans des mécanismes épigénétiques, entre les différents modèles animaux détenus par les équipes de l'unité. Je me suis, d'une part, consacrée à l'optimisation du protocole d'HIS, et d'autre part, à l'analyse de l'expression de gènes codants des ARNs non-codants dans le cerveau. D'abord, l'ARN non-codant *Ftx* a été analysé pour l'équipe de C. Rougeulle ayant pour thématique : « ARNs non-codants, différenciation et développement ». Poursuivant cette problématique des ARNs non-codants, j'ai ensuite abordé d'autres aspects techniques du marquage par HIS en contribuant à l'analyse de *SatIII* (*un marqueur de microsatellite de l'ADN*), pour l'équipe de C. Francastel, dont la thématique est « méthylation de l'ADN et ARNs non-codants en physiopathologie ». Si *SatIII* reste dans cette problématique des ARNs non-codants, son analyse ajoute une problématique supplémentaire puisqu'il s'agit d'une séquence répétée. Ceci m'a permis de travailler sur les mises au point de protocoles et d'optimiser la technique de marquage par HIS. Dans ce mémoire, je ne développerai pas ce travail préliminaire qui m'a permis de m'approprier ce genre d'analyses, que j'ai pu ensuite appliquer largement pour une étude approfondie du phénotype induit par l'inactivation du facteur HSF2.

Mon sujet de recherche s'est alors articulé autour de l'étude du rôle dans le cerveau du facteur de transcription HSF2 dans l'équipe de Valérie Mezger, dont la thématique est « Interface entre développement et environnement ».

Cette équipe étudie le lien entre le développement des mammifères, et la réponse au stress environnemental, qui implique des régulations épigénétiques. Ces aspects sont abordés plus particulièrement par l'étude du cerveau en conditions physiologiques ou pathologiques. Cette équipe s'intéresse en particulier aux facteurs dits « de réponse aux chocs thermiques », les *heat shock factors* (HSF), qui sont des facteurs de transcription qui représentent un point d'interaction unique entre environnement, épigénétique et développement. Elle étudie plus particulièrement deux des facteurs HSFs : HSF1 et HSF2. Les HSFs sont impliqués dans la réponse cellulaire au stress protéotoxique, et HSF2, plus particulièrement, est actif dans le cerveau en cours de développement. L'équipe dirigée par Valérie Mezger s'intéresse à la façon dont ces facteurs contribuent au devenir des cellules en régulant notamment l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le développement du cerveau. L'objectif est de comprendre les liens entre les programmes de développement et les mécanismes qui régissent la réponse au stress environnemental, et à plus long terme pouvant être impliqué dans des défauts chez l'adulte. J'ai intégré cette équipe en fin d'année 2013 dans le cadre de mon projet de recherche, en vue de l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études, EPHE. Mon projet vise à mettre en évidence l'implication du facteur de transcription HSF2 dans la réponse au stress alcoolique dans le cerveau au cours du développement, et à caractériser son rôle dans le cerveau adulte en étudiant les animaux dont le gène *HSF2* est inactivé.



# Introduction générale



**Figure 1 : Représentation schématique simplifiée du développement embryonnaire murin du zygote à la neurulation**

*Représentation schématique simplifiée des principales étapes du développement embryonnaire murin. Après fécondation les cellules subissent une étape de segmentation (mitoses successives). Au stade E4.0, il y a la formation d'une cavité : le blastocœle. À partir du stade E5.0 les cellules commencent à se différencier, et la division cellulaire devient asynchrone. La gastrulation (E6.5 - E7.0) marque l'invagination de cellules dans l'embryon conduisant à la formation du mésoderme. Les trois feuilletts se mettent en place (ectoderme, endoderme, mésoderme). Le neurectoderme sera à l'origine de la plaque neurale qui va s'invaginer à partir du stade E7.5 et former le tube neural.*

# Introduction générale

---

## I. Développement du cerveau murin

### 1. Du zygote à la neurulation

Le zygote, résultat de la fusion de deux cellules appelées gamètes, le spermatozoïde et l'ovule (McGrath et Solter 1984; Motosugi et al. 2006; Surani, Barton, et Norris 1984), subit de nombreuses transformations développementales (« The House Mouse » s. d.) pour aboutir à l'apparition du feuillet ectodermique qui donne naissance au tube neural (**Figure 1**). L'ovule fécondé passe par une étape de segmentation. C'est une succession de mitoses, dont les cellules-filles portent le nom de blastomères (Gardner 2001; Gilbert 2000). Les blastomères ne subissent pas de croissance entre chaque division synchrone. L'embryon conserve sa taille et les cellules qui se divisent deviennent de plus en plus petites. Chez la souris lorsque l'embryon s'est divisé entre 4 et 16 cellules soit 2 jours après la fécondation (chez l'humain c'est environ 16 et 64 cellules, 4 jours après la fécondation), on parle du stade de morulation (Gilbert 2000). Jusqu'à ce stade, les cellules qui composent l'embryon sont totipotentes. Elles sont capables de se différencier en n'importe quelle cellule, et organes transitoires qui accompagnent l'embryon (tissus non embryonnaires), pour donner un individu entier (Lim et al. 2016; Motosugi et al. 2005; Tarkowski et al. 2010).

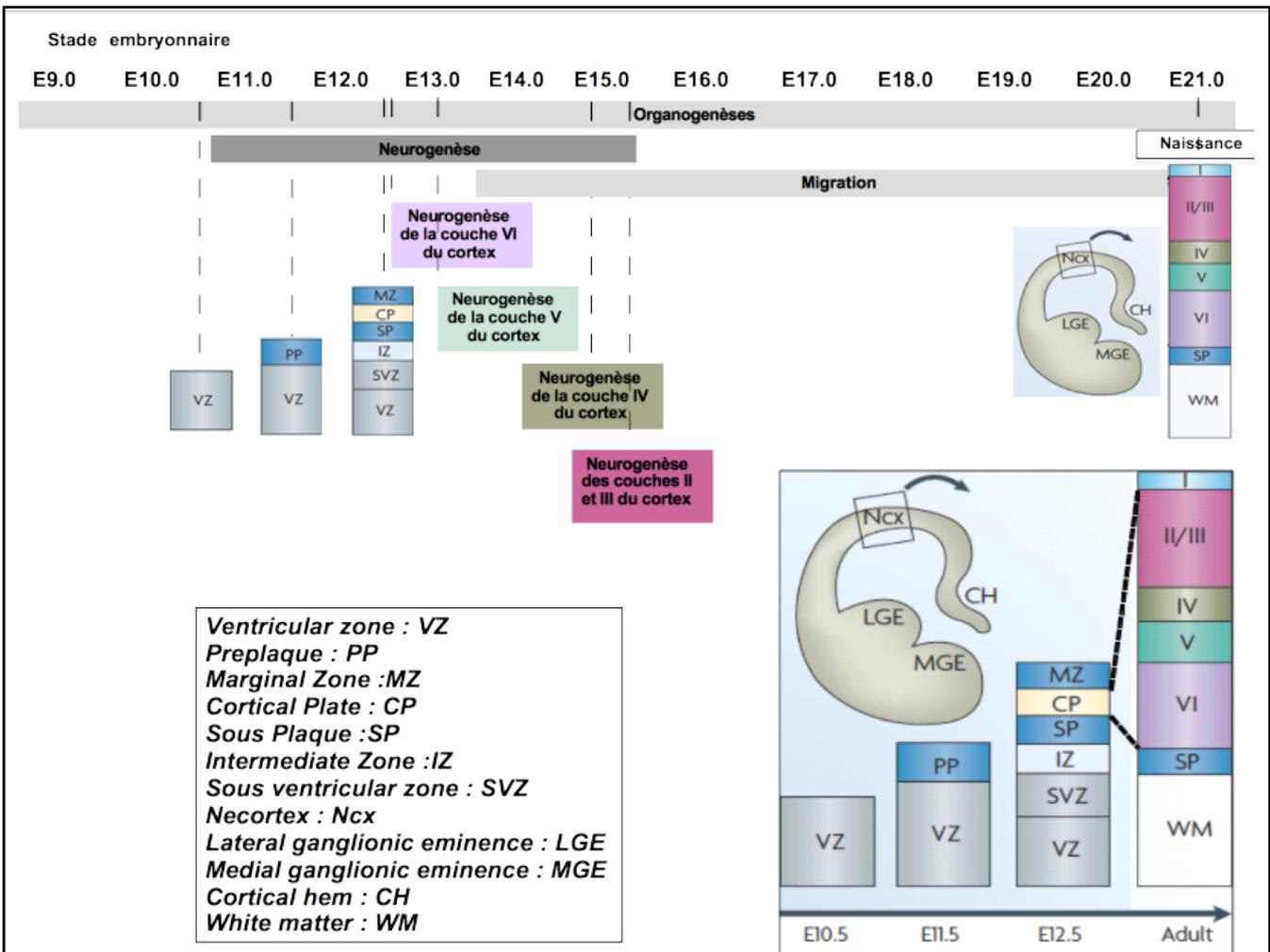
Au stade blastula, lorsque l'embryon atteint entre 16 et 40 cellules, 3 jours après la fécondation (128 cellules chez l'humain 5 jours après la fécondation), certaines cellules commencent à se différencier. L'embryon s'allonge et il y a formation d'une cavité, le blastocœle (Jedrusik et al. 2008; Kim, Gye, et Kim 2004; Perea-Gomez et al. 2007), entre le trophoblaste (à l'origine des structures extra-embryonnaires : placenta, cordon ombilical), et les cellules de la masse interne (MCI). Ces cellules de la MCI sont pluripotentes (Avilion et al. 2003; Lim et al. 2016; Zernicka-Goetz 2004), et sont capables

de se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée de l'embryon, hors annexes extra-embryonnaires ; elles constitueront alors l'embryon proprement dit. S'en suivent des divisions cellulaires asynchrones, et une invagination des cellules dans l'embryon qui forme le nœud et la ligne primitive (**Figure 1**). Ces mouvements cellulaires typiques, qui aboutissent à la formation du mésoderme, caractérisent le stade de gastrulation (Perea-Gomez et al. 2004). Ceci donne naissance à la fin de la gastrulation, aux trois feuillets embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme, et l'endoderme (Beddington et Robertson 1999; Rivera-Pérez et Hadjantonakis 2015; Snow 1977).

L'ectoderme est le feuillet à l'origine de l'épiderme, et du neurectoderme qui donnera naissance au système nerveux central. Dans la région dorsale de l'embryon des cellules de l'ectoderme se différencient pour former la plaque neurale (Stuhlmiller et García-Castro 2012). Cette plaque va s'invaginer et se refermer sur elle-même pour former le tube neural, qui deviendra l'encéphale dans sa partie antérieure (ou rostrale) et la moelle épinière dans sa partie postérieure, ou caudale (Copp, Greene, et Murdoch 2003).

## 2. Migration neuronale et formation des couches corticales

Pendant le développement, le tube neural est au départ formé d'une seule couche de cellule, la zone ventriculaire qui fait face à la lumière du tube (ou ventricule). C'est la région qui contient les progéniteurs neuraux, et des cellules mitotiques qui vont générer les neurones post-mitotiques, qui délimiteront une deuxième couche de corps cellulaires qui vont se localiser dans la partie basale du tube neural: ils forment alors la zone du manteau (Gilmore et Herrup 1997; Marin-Padilla 1978). Chez la souris, au 11<sup>ème</sup> jour de la gestation, au début de la neurogénèse corticale, la zone ventriculaire donne d'abord naissance à la pré-plaque (preplate, PP) neuronale par migration radiaire des jeunes neurones. Au 12<sup>ème</sup> jour de la gestation (E12.5), la pré-plaque se scinde en deux couches par l'arrivée de nouveaux jeunes neurones, et forme les couches de la sous-plaque (subplate, SP). Les jeunes neurones vont former la plaque corticale (cortical plate, CP) entre ces deux couches. La plaque corticale est ensuite alimentée par l'arrivée de plusieurs vagues de jeunes neurones pour constituer les six couches du cortex, toujours par migration radiaire. Chaque nouvelle vague de neurones rejoint les couches les plus externes du cortex, ainsi les couches superficielles sont formées par les neurones les plus jeunes (Molyneaux et al. 2007). Cette migration se fait le long des cellules de la glie



**Figure2 : Représentation schématique de la formation des couches corticales chez la souris**

Représentation schématique de la formation des couches corticales au cours des stades de développement embryonnaire. Figure réalisée à partir de la figure 1 de la revue de Bradley J.Molyneaux, et al de 2007. Les neurones sont d'abord générés pendant la neurogenèse du stade E11.0 au stade E15.5. Les couches corticales s'établissent couche par couche en nourrissant la plaque corticale par migration radiaire. Ventricular zone : **VZ** ; Preplaque : **PP** ; Marginal Zone : **MZ** ; Cortical Plate : **CP** ; Sous Plaque : **SP** ; Intermediate Zone : **IZ** ; Sous ventricular zone : **SVZ**, **Neocortex** : **Ncx** ; Lateral ganglionic eminence : **LGE** ; Medial Ganglionic eminence : **MGE** ; Cortical hem : **CH** ; White Matter : **WM**.

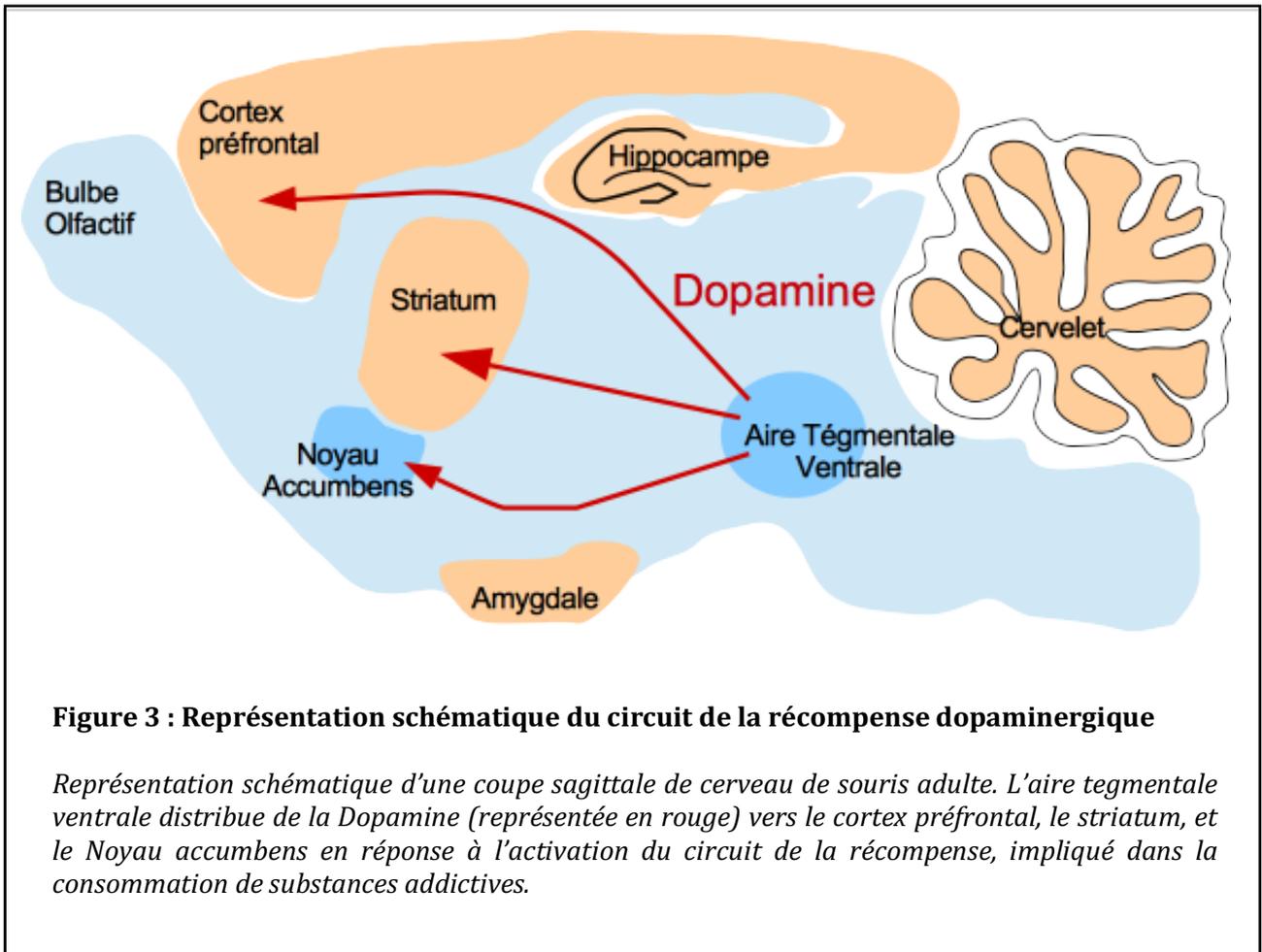
radiaire, qui servent de support aux neurones. Lorsque la migration est terminée, les neurones ont une période de maturation pendant laquelle, notamment, les connexions neuronales vont s'établir (**Figure 2**)

Contrairement à ces cellules nerveuses, dites pyramidales (neurones excitateurs), qui migrent de façon radiaire, la majorité des neurones non pyramidaux et inhibiteurs dérivent des éminences ganglionnaires médianes et ventrales et suivent une voie de migration tangentielle vers le cortex (Parnavelas 2000; Anderson et al. 2001; Nadarajah et al. 2003).

### 3. Fonctions de structures d'intérêt du cerveau dans notre étude

Le cortex cérébral est la partie la plus superficielle du cerveau, organisée en couches et en aires cérébrales. Cette substance grise du cerveau contient deux types de cellules : des neurones (interneurones inhibiteurs et neurones excitateurs), et des cellules gliales. C'est le foyer des fonctions nerveuses les plus élaborées. Le cortex cérébral reçoit les informations sensorielles principalement par l'intermédiaire du thalamus. L'information est ensuite traitée dans les différentes aires cérébrales, et ces circuits très complexes sont, entre autres, à l'origine du raisonnement et de la pensée. Le cortex cérébral est à l'origine des réponses comportementales ; il est essentiel pour la conscience, la mémoire, la sensibilité, le langage, la motricité volontaire et sa coordination. Il fonctionne grâce aux connexions établies avec les autres structures nerveuses, à nouveau par l'intermédiaire du thalamus ou, en renvoyant directement une information motrice en allant connecter les motoneurones de la moelle épinière et de la médulla, c'est la réponse comportementale motrice.

Au cours de mon projet de recherche, une structure corticale que j'ai particulièrement analysée est l'hippocampe, une structure corticale qui est un acteur majeur pour la consolidation de la mémoire, ou mémoire à long-terme, et pour la mémoire spatiale. L'hippocampe, comme la partie ventrale du striatum (noyau accumbens), le cortex préfrontal et l'amygdale sont des régions qui reçoivent des afférences dopaminergiques



**Figure 3 : Représentation schématique du circuit de la récompense dopaminergique**

*Représentation schématique d'une coupe sagittale de cerveau de souris adulte. L'aire tegmentale ventrale distribue de la Dopamine (représentée en rouge) vers le cortex préfrontal, le striatum, et le Noyau accumbens en réponse à l'activation du circuit de la récompense, impliqué dans la consommation de substances addictives.*

de l'aire tegmentale (**Figure3**) ventrale et forment les circuits de la récompense, qui gèrent les processus motivationnels et sont impliqués dans les mécanismes d'addiction. La partie du cœur de l'accumbens est engagée dans le contrôle de l'apprentissage de l'accoutumance, en relation avec l'amygdale. La partie de la coquille de l'accumbens, elle, est impliquée dans l'activation du contrôle d'information, dépendant de l'hippocampe dans l'apprentissage de l'accoutumance (Zahm 1999; Ito et Hayen 2011; Cruz et al. 2014)

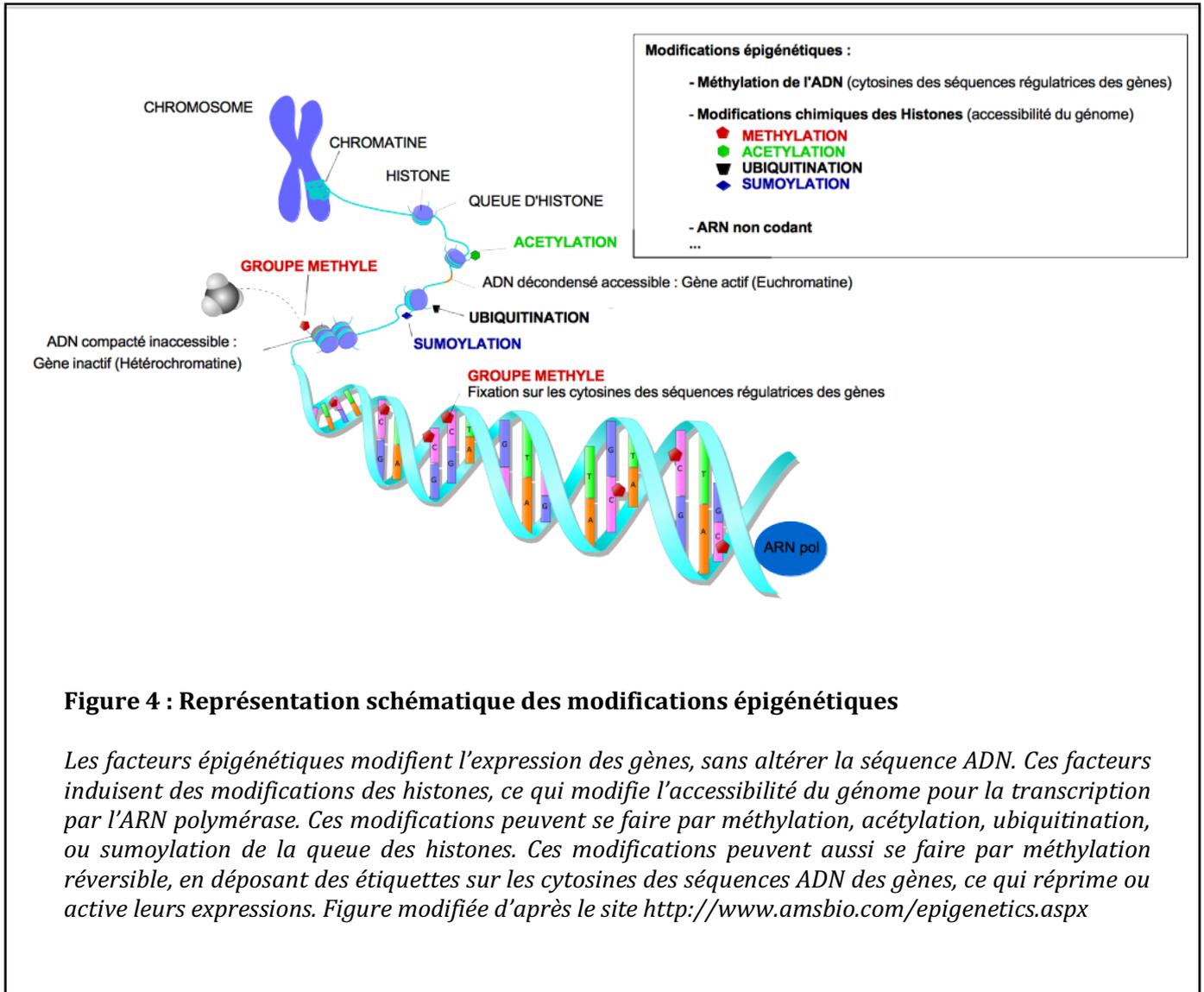
## **II. Destin cellulaire au cours du développement : mécanismes épigénétiques**

### 1. Différenciation des cellules souches embryonnaires

Dans les premiers stades du développement, pendant la morulation et la blastulation, les cellules embryonnaires n'ont pas encore d'identité cellulaire spécifique. Ces cellules sont totipotentes et sont par définition, capables de se différencier en tous les types cellulaires du futur embryon. La différenciation cellulaire est un processus de spécialisation morphologique, et métabolique. Elle est possible par des régulations transcriptionnelles spécifiques qui se mettent en place pendant le développement. Les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation fixent la séquence régulatrice des gènes effecteurs spécifiques de la différenciation cellulaire pour induire ou inhiber l'expression de ces gènes cibles. Ce mécanisme sous-entend que pour être régulée, la séquence régulatrice de ces gènes doit être accessible aux facteurs de différenciation au sein de la chromatine. L'accessibilité de la chromatine est contrôlée par des mécanismes fins appelés mécanismes épigénétiques.

### 2. Les modifications épigénétiques

Dans le noyau l'ADN est associé à des protéines, principalement des histones (sur lesquelles il s'enroule), qui déterminent la structure de la chromatine. C'est, en partie, le niveau de compaction de la chromatine qui déterminera les gènes qui seront accessibles



**Figure 4 : Représentation schématique des modifications épigénétiques**

*Les facteurs épigénétiques modifient l'expression des gènes, sans altérer la séquence ADN. Ces facteurs induisent des modifications des histones, ce qui modifie l'accessibilité du génome pour la transcription par l'ARN polymérase. Ces modifications peuvent se faire par méthylation, acétylation, ubiquitination, ou sumoylation de la queue des histones. Ces modifications peuvent aussi se faire par méthylation réversible, en déposant des étiquettes sur les cytosines des séquences ADN des gènes, ce qui réprime ou active leurs expressions. Figure modifiée d'après le site <http://www.amsbio.com/epigenetics.aspx>*

ou non à l'ARN polymérase pour la transcription. La compaction de l'ADN, et donc l'expression des gènes, est régulée par des modifications dites épigénétiques (**Figure 4**). C'est Conrad Waddington qui redéfinit le terme épigénétique en 1942. Ce généticien, posa le problème de la capacité qu'ont les génotypes à induire des phénotypes différents. Les modifications, ou « étiquettes » épigénétiques sont apportées sur l'ADN sans altération de sa séquence en réponse à l'action de facteurs environnementaux, ou développementaux, et sont altérés dans de nombreuses pathologies, dont le cancer. Il s'agit principalement de modifications chimiques des **histones**, par acétylation, méthylation, sumoylation, ou encore ubiquitination et, de modifications chimiques réversibles de l'ADN, au niveau des bases des séquences régulatrices des gènes, telles que la méthylation. Ces modifications des bases ou des protéines associées à l'ADN sont transmissibles, elles se maintiennent au cours des divisions cellulaires, et sont réversibles (Tordera, Sendra, et Pérez-Ortín 1993; Santos et Dean 2004; Bannister et Kouzarides 2011)

S'il est bien connu que les facteurs environnementaux, dont le stress, engendre des modifications de la méthylation de l'ADN, comme par exemple à la suite d'un stress alcoolique (Kaminen-Ahola et al. 2010; Laufer et al. 2013; Kleiber et al. 2014), il reste à élucider les mécanismes par lesquels le stress régule cette méthylation. Les protéines responsables de la méthylation de l'ADN sont des ADN méthyl transférases (DNMT). Elles régulent l'expression des gènes au cours du développement normal, et en réponse aux facteurs environnementaux. Ces éléments suggèrent que le stress pourrait agir sur ces protéines et être impliqué dans des modifications de l'épigénome.

### 3. Les ADNs méthyltransférases : *DNA methyltransferase*, DNMT

La première modification épigénétique à avoir été mise en évidence, et celle qui est la mieux caractérisée, est la méthylation dans le génome des cytosines situées dans des dinucléotides CpG, regroupés au sein de séquences appelées « îlots CpG ». Les profils de méthylation de ces îlots se mettent en place très tôt au cours du développement, par l'action conjointe de quatre protéines d'une même famille d'enzymes : les ADN méthyltransférases. Il s'agit de : DNMT1 et de trois membres de la famille DNMT3 (DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L). Ces protéines catalysent le transfert de groupe méthyle

sur une cytosine par l'utilisation d'un co-substrat donneur de groupement méthyle (Chiang et al. 1996).

Alors que DNMT1 est en charge du maintien de la méthylation au cours des divisions cellulaires, la mise en place de cette méthylation est attribuée à DNMT3A et DNMT3B. En effet, il a été montré que les deux protéines sont impliquées dans la « méthylation *de novo* » de l'ADN (Okano et al. 1999; Hsieh 1999). DNMT3A est impliquée dans la méthylation des séquences régulatrices des gènes, alors que DNMT3B est plus impliquée dans la méthylation des séquences entourant les centromères (Gopalakrishnan et al. 2009).

Des mutations sur le gène *Dnmt3b* induisent le syndrome d'immuno-déficience combinée, d'instabilité de l'hétérochromatine paracentromérique et de dysmorphie faciale, soit en anglais ICF (*Immunodeficiency, Centromeric region instability, Facial anomalies*). Ce syndrome se caractérise par une hypométhylation de l'ADN dont le rôle dans ICF n'est pas encore bien compris mais qui montre que DNMT3B est un facteur de régulation de la transcription des gènes impliqués dans le développement (Ehrlich 2003; Xie et al. 2006; Ehrlich et al. 2008).

### **III. Effet du stress sur le développement du cerveau : syndrome d'alcoolisation fœtale, SAF**

De nombreux facteurs environnementaux peuvent soumettre l'embryon au stress et affecter son développement normal. Il est connu que des épisodes de fièvres, la malnutrition ou encore une exposition à l'alcool peuvent avoir des conséquences pathologiques sur le développement fœtal et particulièrement au niveau du cerveau. Le syndrome SAF (syndrome d'alcoolisation fœtale) est la conséquence de la consommation d'alcool au cours de la gestation (Jones et Smith 1973). Il représente la cause la plus importante de retard mental d'origine non génétique chez l'homme. Il concerne 1% des naissances. L'expression de ce syndrome sous sa forme la plus grave, est défini par des lésions cérébrales entraînant le dysfonctionnement du système nerveux central, des retards de croissance prénataux et postnataux, et une dysmorphie craniofaciale particulière (petites fentes palpébrales, sillon sous-nasal aplati et lèvre supérieure mince)

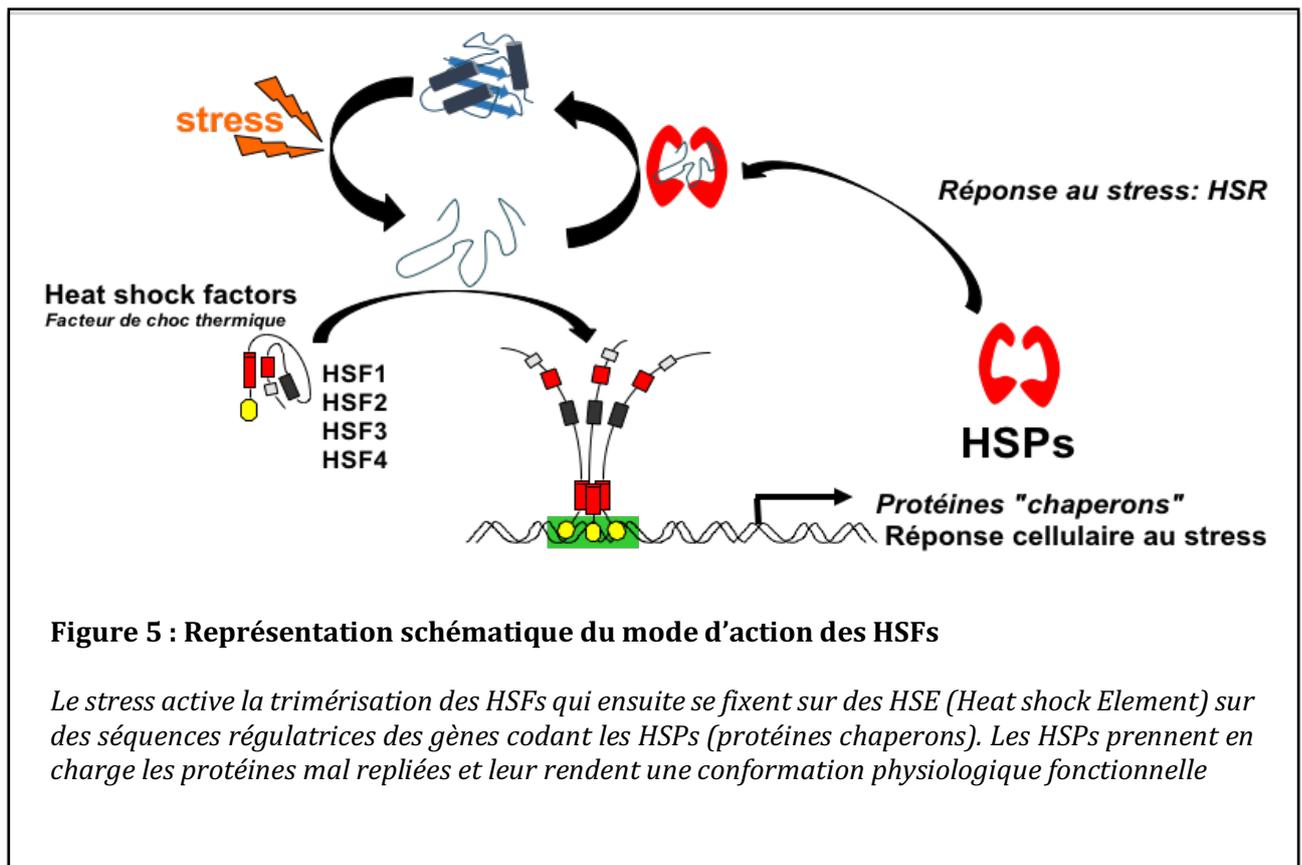
(Eugene Hoyme et al. 2005). Ces atteintes irréversibles peuvent être causées à tout moment de la gestation. Elles sont fonction de la dose, de la période et de la durée de l'exposition à l'alcool. Le métabolisme de la mère et son environnement sont également des facteurs importants qui modulent la sévérité de ce syndrome. L'exposition fœtale à l'alcool affecte le développement cortical du cerveau. Des études *post mortem* de cerveaux d'enfants sujet au SAF, ont montré une réduction du poids du cerveau, des perturbations de la lamination corticale horizontale et un manteau cortical plus fin (Gressens et al. 2001; Thompson, Levitt, et Stanwood 2009; Clarke et Gibbard 2003; Valenzuela et al. 2012).

#### **IV. Les facteurs de transcription HSF, *Heat Shock factors*, médiateurs dans le stress**

##### **1. Les facteurs de réponse au stress cellulaire**

Les facteurs de stress HSFs, *heat shock factors*, sont des facteurs de transcription, dont l'activité a été initialement décrite en 1962 dans un contexte de stress par choc thermique chez la drosophile (Ritossa 1962). Chez les mammifères, il a été décrit cinq HSFs : HSF1, à 4, et HSFy (Jin et al. 2011). La réponse cellulaire au stress (*heat shock response*, ou HSR), induit la régulation de la transcription de gènes cibles (Sorger 1991; Morimoto 1993; Fujimoto et al. 2010; Jin et al. 2011). Chez les mammifères, HSF1, HSF2 et HSF4 induisent la régulation de la transcription de gènes codant des protéines chaperons HSPs. Quant à HSF3, après choc thermique, il régule la transcription de gènes codant des protéines chaperons non classiques (PDZK3 et PROM2) (Fujimoto et al. 2010, 3). HSF1 est nécessaire pour induire la réponse au stress thermique, alors que HSF2 et HSF4 jouent un rôle secondaire de modulateurs d'expression de gènes pour ce stress. L'activation de HSF1 par choc thermique induit la régulation de la transcription de *HSP70* chez de nombreux modèles eucaryotes, dont la levure, la drosophile, et la souris (Clos et al. 1990; Parsell, Taulien, et Lindquist 1993; Trinklein et al. 2004; Murapa et al. 2007).

Les HSFs sont aussi impliqués dans d'autres types de stress (Morimoto 1993) : l'exposition aux « acides aminés analogues », l'exposition aux métaux lourds (Boone et Vijayan 2002; Koizumi, Suzuki, et Yamaguchi 2013), l'exposition aux situations



**Figure 5 : Représentation schématique du mode d'action des HSFs**

*Le stress active la trimérisation des HSFs qui ensuite se fixent sur des HSE (Heat shock Element) sur des séquences régulatrices des gènes codant les HSPs (protéines chaperons). Les HSPs prennent en charge les protéines mal repliées et leur rendent une conformation physiologique fonctionnelle*

physiopathologiques, par exemple lésions neuronales, ou exposition à des pathogènes (Kantengwa et Polla 1993; Nicholls et al. 2009), le stress oxydatif (X. D. Liu et Thiele 1996), ou encore le stress alcoolique (El Fatimy et al. 2014)

## 2. Mode d'action des HSFs

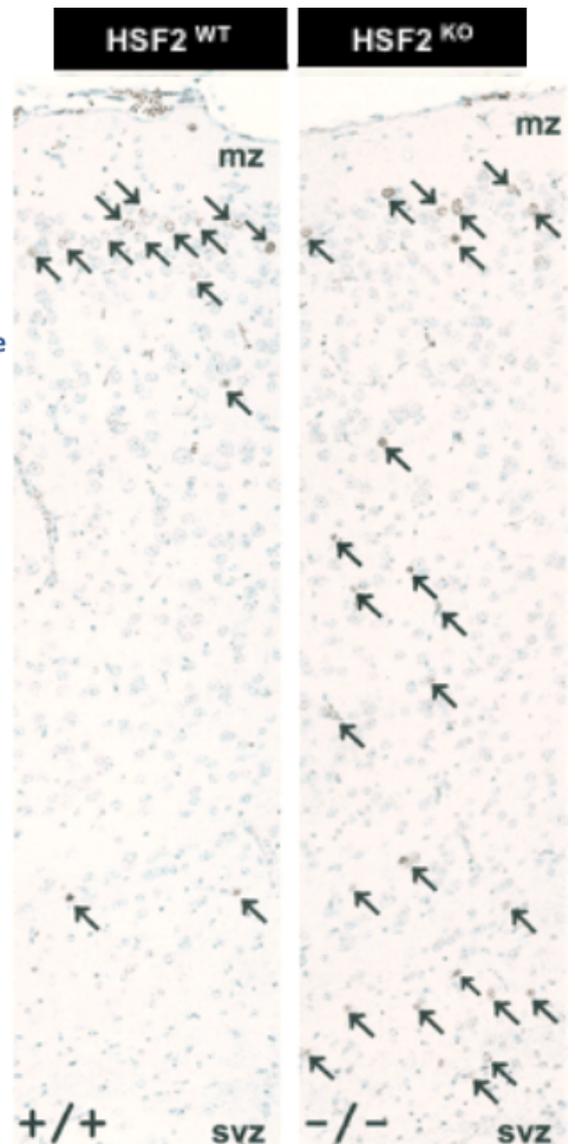
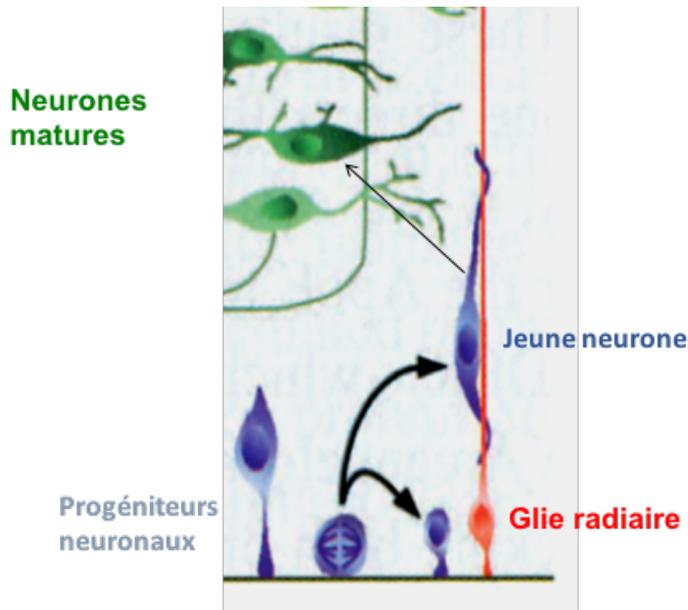
L'exposition à l'alcool ou le choc thermique induit une réponse cellulaire par l'activation des facteurs HSFs, qui agissent sur leurs gènes cibles en régulant leur transcription. Pour permettre cette régulation, les HSFs sont phosphorylés et acétylés et trimérisent en situation de stress (Morimoto 1993; Rabindran et al. 1993; P. C. C. Liu et Thiele 1999). Dans le noyau, alors sous leurs formes actives, ils se lient au niveau des séquences régulatrices de leurs gènes cibles sur un site appelé HSE (*heat shock element*). Cette liaison va induire la transcription de ces gènes cibles (**Figure 5**), dont les gènes codant les HSPs (*heat shock proteins*). L'exposition au stress conduit à des aberrations de repliement de protéines. Les HSPs, qui sont des protéines, dites « chaperons », interviennent alors en se fixant sur les protéines mal repliées, afin de rétablir leur conformation fonctionnelle. Ainsi cette réponse permet de limiter les agrégats protéiques pouvant conduire à une dysfonction, puis une mort cellulaire.

## V. HSF2 est nécessaire dans le développement du cerveau embryonnaire

### 1. Rôle de HSF2 dans la migration neurale

De nombreuses études ont montré que le facteur HSF2, joue un rôle physiologique majeur dans le développement, en dehors de son rôle dans la réponse au stress. Notre équipe a notamment montré que HSF2 intervient en absence de stress identifié : lors de la gamétogenèse (Abane et Mezger 2010), au cours de la méiose (Kallio et al. 2002a), et au cours du développement dans la formation du cerveau (Rallu et al. 1997) .

L'absence de HSF2 affecte plusieurs régions du cerveau adulte. Notre équipe a pu observer que la morphologie du cerveau était perturbée en son absence: les hippocampes sont plus petits et les ventricules cérébraux latéraux sont élargis (Kallio et al. 2002a) .



**Figure 6 : Perturbation de la migration neuronale chez les souris HSF2 KO**

*A gauche: Migration radiaire d'un jeune neurone vers les couches corticales.*

*A droite: expérience de marquage au BrDU réalisée sur des embryons de souris E16.5 WT ou HSF2 KO, et montrant le positionnement des neurones marqués dans les couches corticales à P30. Chez les souris adultes WT la migration neuronale aboutit à une accumulation des neurones marqués dans les couches superficielles du cortex. Chez les souris HSF2 KO, la migration est incomplète : les neurones marqués sont étalés sur toute la surface du cortex. D'après El Fatimy et al. 2014*

Au cours du développement, en absence de HSF2, les cellules de la glie radiaire sont affectées (Chang et al. 2006). Les cellules de la glie radiaire sont des progéniteurs neuraux dont la fonction est aussi de supporter la migration radiaire des neurones. Dans le cortex cérébral, les jeunes neurones migrent le long des prolongements basaux de ces cellules et rejoignent ainsi les couches superficielles du cortex. En réalisant un suivi des neurones marqué par le BrdU (bromodésoxyuridine), un analogue structural de la thymidine capable de s'incorporer à l'ADN en cours de réplication, notre équipe a montré que de nombreux neurones n'atteignent pas la couche externe du cortex cérébral des animaux *Hsf2* KO (**Figure 6**, d'après la figure 4 de l'article Chang *et al.* 2006), suggérant un défaut de migration neuronale.

Par ailleurs deux populations neurales importantes pour le développement du cerveau sont particulièrement atteintes chez les animaux KO pour *Hsf2* : les cellules de la glie radiaires et les astrocytes qui en découlent sont considérablement réduits lorsque HSF2 n'est pas présent (Chang et al. 2006). Également, on observe une diminution du nombre des cellules de Cajal-Retzius, qui expriment le gène Reelin et sont impliquées dans la migration correcte des jeunes neurones (Bielle et al. 2005). L'absence de HSF2 affecte donc le développement du cortex cérébral, notamment en perturbant la migration neuronale très tôt au cours du développement (Abane et Mezger 2010).

## 2. Les cibles embryonnaires de HSF2

Aucun lien clair n'a été établi entre l'expression de *Hsf2* au cours du développement embryonnaire et celle des gènes HSP (impliqué dans la réponse au choc thermique) (Rallu et al. 1997; Wang et al. 2003), bien que HSF2 soit très actif au cours de l'embryogenèse (Mezger et al. 1994; Murphy et al. 1994; Christians et al. 1997; Rallu et al. 1997; Alastalo et al. 1998; Kallio et al. 2002a; Wang et al. 2003). Ces éléments suggèrent que les HSP ne sont pas une cible développementale de HSF2, et que cette dernière cible d'autres gènes, essentiels dans le processus développemental.

La recherche de gènes cibles de HSF2 au cours du développement a permis d'identifier le mécanisme probable par lequel l'absence de HSF2 produit des défauts de migration. Des

analyses transcriptomiques ont permis d'identifier des gènes régulés potentiellement par HSF2, parmi lesquels des gènes impliqués dans la lamination corticale. Dans le cerveau embryonnaire, l'expression de ces gènes, tels que *p35* et les gènes *MAPs* (*microtubules associated proteins*, tel que *Dclk* et *Dcx*) est altérée en absence de HSF2. Par une approche d'immunoprécipitation de chromatine, la fixation de HSF2 sur un site HSE du promoteur de *p35*, un activateur de *Cdk5* (*cyclin-dependent kinase*), a aussi pu être confirmée (Chang et al. 2006; El Fatimy et al. 2014). Cette séquence HSE se trouve dans une région très conservée entre l'Homme, et la souris et se situe près du site d'initiation de la transcription et de deux séquences répétées GC dans le promoteur de *p35*. Ces gènes, cibles physiologiques de HSF2, sont impliqués dans la migration neuronale, ainsi que dans la division cellulaire. Chez les animaux inactivés pour *Hsf2*, l'absence de la fixation de HSF2 sur ces cibles développementales, impliquées dans la migration neuronale, conduirait donc à des défauts de ce processus et à des anomalies cérébrales.

## **VI. HSF2 est un médiateur majeur de défauts développementaux dans la réponse au stress alcoolique**

Plusieurs travaux montrent que l'exposition fœtale à l'alcool affecte le développement cortical du cerveau (Gressens et al. 2001; Zhou et al. 2001; Santillano et al. 2005; Rubert et al. 2006). Par ailleurs, l'équipe a montré qu'un stress alcoolique prénatal induit l'activation du facteur HSF2, dans le cerveau embryonnaire (El Fatimy et al. 2014). Ainsi, en utilisant un paradigme de stress prénatal mimant le syndrome d'alcoolisation fœtale dans des modèles murins (E15.5 à E18.5), notre équipe a montré que HSF2 est un médiateur des défauts développementaux caractéristiques du stress généré par l'exposition fœtale à l'alcool (El Fatimy et al. 2014).

Ces travaux suggèrent une combinaison différentielle des HSF entre eux en fonction du stress :

- Dans un contexte de choc thermique, HSF1 est le facteur essentiel de la réponse au stress : son activation libère la protéine chaperon HSP90 à laquelle il est associé dans un contexte physiologique. Cette libération favorise le maintien de la protéasome.

- Dans un contexte de stress alcoolique, HSF1 et HSF2 s'associent sous forme d'hétérotrimères. La modification de l'équilibre d'association de ces facteurs modifie leurs cibles et perturbe ainsi le profil d'expression des gènes ciblés (El Fatimy et al. 2014).

Ainsi, en conditions physiologiques, dans le cerveau en développement, HSF2 se fixe sur une séquence spécifique du promoteur du gène *p35* et participe à son induction transcriptionnelle. A la suite d'un stress alcoolique, HSF2, alors associé à HSF1 se détache du HSE du gène *p35*, réprimant alors sa transcription.

L'hypothèse proposée par l'équipe est que ce complexe HSF1-HSF2, formé à la suite d'un stress alcoolique, empêcherait la fixation de HSF2 sur les sites HSE de ces gènes cibles physiologiques, dont les gènes *MAP* impliqués dans la migration neuronale.

## VII. Projet de recherche :

Notre équipe a pu mettre en évidence le rôle essentiel du facteur HSF2 au cours du développement, en dehors du contexte de la réponse au stress cellulaire par lequel il a été découvert, et pour lequel il est un médiateur majeur. L'ensemble de ces éléments indique que l'absence du facteur HSF2 perturbe le développement physiologique du cerveau, mais que son expression en cas d'alcoolisation fœtale est un facteur aggravant de troubles développementaux, du fait de son rôle dans la réponse au stress. Notre équipe cherche donc à mieux comprendre la complexité de la fonction de ce facteur de transcription chez l'embryon et chez l'adulte, et dans ces deux contextes : au cours du stress et dans un contexte physiologique. Pour cela l'équipe a entrepris, entre autres, d'identifier et de préciser :

- Les cibles moléculaires embryonnaires de HSF2, pour comprendre les gènes qu'il régule d'un point de vue transcriptionnel et les conséquences de telles modulations de l'expression génique
- Les conséquences des interactions de HSF2 avec des facteurs qui sont impliqués dans des modifications épigénétiques (plusieurs de ces partenaires ont été mis en évidence par l'équipe)
- Les conséquences fonctionnelles des multiples modifications post traductionnelles subies par HSF2 en différents contextes

- Les altérations morphologiques du cerveau induites par l'absence du facteur HSF2
- Les conséquences fonctionnelles et neuropathologiques de l'absence du facteur HSF2 et de l'activation de ce facteur en condition de stress.

Mon projet de recherche s'est donc inscrit dans cette démarche en participant à deux projets de l'équipe :

- La compréhension de la fonction de HSF2 en condition de stress chez l'embryon. Ce projet vise à identifier les cibles moléculaires de HSF2 et d'éventuels partenaires dans le cortex d'embryons de souris. Pour cela j'ai contribué à l'optimisation de protocoles expérimentaux.
- La compréhension de sa fonction physiologique. Ce projet vise à caractériser les défauts morphologiques et cellulaires du cerveau de souris adultes mutantes pour l'expression du gène *Hsf2*. Pour cela, j'ai optimisé et mené différentes expériences histologiques.

Ce dernier axe de mon projet s'inscrit dans une démarche de développement d'un service d'histologie pour notre unité de recherche. Il a pour objectif de proposer aux équipes, dans le cadre d'un service commun, un soutien et/ou un service pour :

- La réalisation de coupes de tissus,
- Le marquage de coupes par différentes techniques
- L'analyse histologique des coupes marquées

## **Chapitre I**

# **Fonctions du facteur HSF2 dans le cortex cérébral au cours du développement en réponse au stress alcoolique**

# Chapitre I - Fonctions du facteur HSF2 dans le cortex cérébral au cours du développement en réponse au stress alcoolique

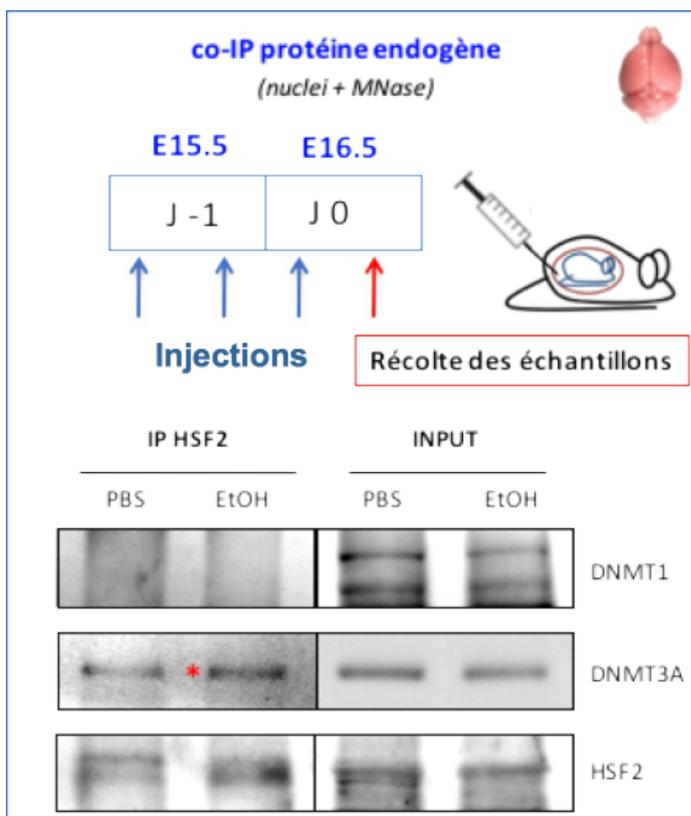
## Introduction

### I. Les partenaires de HSF2 dans la réponse au stress

Les mécanismes moléculaires et cellulaires dans lesquels HSF2 est engagé en réponse aux stress environnementaux prénataux, interfèrent avec les processus physiologiques dans lesquels il est impliqué au cours du développement et dans la maturation du cortex. L'équipe a montré que HSF2 interagissait avec plusieurs acteurs de la modulation de l'épigénome, notamment en situation de stress thermique ou alcoolique. L'équipe a ainsi mis en évidence des interactions de HSF2 avec l'ADN méthyl transférase DNMT3A (*DNA methyltransferases*, DNMT), des histones acétyl transférases (HAT) et, des histones déacétylases (HDAC).

Les conséquences de ces interactions avec HSF2 n'ont pas encore été établies avec certitude. Néanmoins, il est connu que des modifications de la méthylation de l'ADN de gènes cibles, comme des modulations de modifications post-traductionnelles des histones associées au locus ciblé (méthylation, acétylations des lysines, sumoylation, ou ubiquitination) peuvent être responsables de modifications de l'expression génique desdits gènes. Les travaux de l'équipe visent à comprendre quand de telles interactions existent, et ce qu'elles impliquent d'un point de vue fonctionnel.

L'équipe a montré que l'acétylation de HSF2 elle-même, pouvait être modulée par des HATs, et des HDACs. Ces expériences ont en particulier montré que les HAT CBP et P300, peuvent interagir avec la protéine HSF2 et l'acétyler, ce qui la stabilise. Suite à un stress



**Figure 7 : HSF2 interagit avec DNMT3A**

*En haut: Schéma du protocole expérimental. Les souris sont injectées successivement à trois reprises, soit par une dose d'éthanol (3g/Kg dans un volume final de 500µl), soit par une dose de PBS(500µl) : à E15.5 (matin et soir,) et à E16 (matin 2h avant le sacrifice).*

*En bas: Analyse des échantillons par western blot montrant (après injections de PBS ou d'éthanol) une co-immunoprécipitation de DNMT3A avec HSF2 (avec un anticorps anti-HSF2) L'interaction avec DNMT3A est spécifique puisque DNMT1 n'est pas immunoprécipité (bien que présents à ce stade dans le cerveau), comme le montre les échantillons Inputs.*

**Federico Miozzo,  
Délara Sabéran-Djoneidi**

thermique, HSF2 est d'abord acétylée, puis très rapidement désacétylée, puis ubiquitinée avant d'être dégradée (collaboration avec le laboratoire dirigé par Lea Sistonen, Turku, Finlande). En condition de stress alcoolique l'acétylation de HSF2 n'est pas suivie de désacétylation, ce qui stabilise la protéine et lui permet de jouer un rôle majeur dans la réponse à l'alcool.

Le stress alcoolique fait intervenir d'autres partenaires tels que les DNMTs. Des expériences de co-IP montrent que le facteur HSF2 interagit avec DNMT3A (**Figure 7**), qui est une des deux enzymes en charge de la méthylation *de novo* de l'ADN (Bernal et Jirtle 2010). Une hypothèse de travail est donc que HSF2 recrute DNMT3A en condition de stress et modifie le paysage chromatinien (par méthylation ou déméthylation de l'ADN) et régule peut-être ainsi l'expression génique.

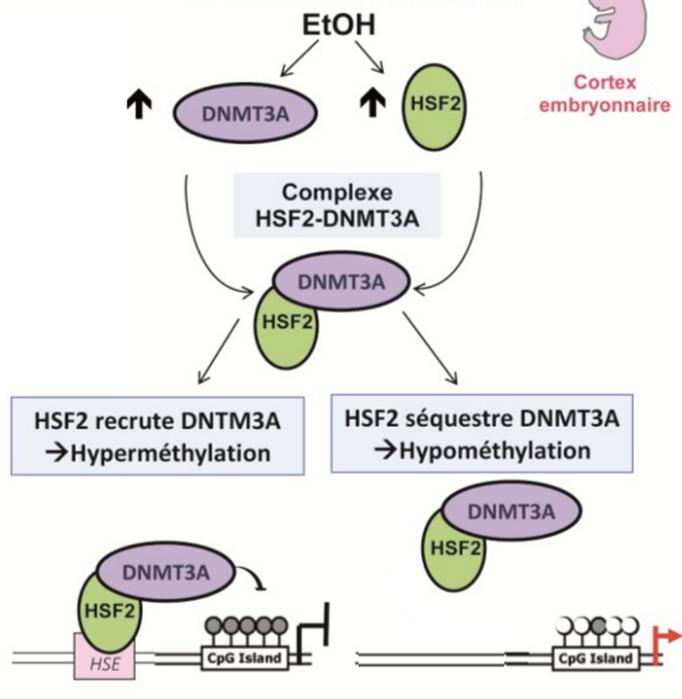
Nous nous focalisons dans un premier temps sur l'étude de l'interaction entre HSF2 et DNMT3A en condition de stress alcoolique. Notre équipe a déjà établi un modèle murin d'alcoolisation fœtale, et notamment deux protocoles d'alcoolisation des souris ont été développés : une alcoolisation aiguë et une alcoolisation chronique.

## II. HSF2 est-il impliqué dans le profil de méthylation du génome en réponse au stress alcoolique ?

Federico Miozzo a montré, lors de sa thèse dans l'équipe, que l'exposition prénatale à l'éthanol (EPA) augmente l'expression de *Hsf2* et de *Dnmt3a* dans le cortex d'embryon de souris à E16.5. Il a pu montrer que cette augmentation était associée à la formation d'un complexe HSF2/DNMT3A (thèse de Federico Miozzo, 2017). Or, plusieurs auteurs ont montré que les tissus adultes d'animaux ayant subi un stress prénatal à l'alcool présentent des modifications de leur épigénome (Probst, Dunleavy, et Almouzni 2009; Kaminen-Ahola et al. 2010), en particulier des modifications de la méthylation de l'ADN (Kleiber et al. 2014; Marjonen et al. 2015). Dans la réponse au stress fœtal, Perera and Herbstman suggèrent que les DNMTs soient à l'origine du remodelage du paysage chromatinien (Perera et Herbstman 2011).

Ainsi le complexe HSF2/DNMT3A pourrait être un des médiateurs de cette redistribution de la méthylation de l'ADN : les modifications du méthylome perturbent l'accessibilité du

## HSF2 permet la redistribution de DNMT3A en réponse à l'exposition foetale à l'éthanol



Agathe Duchateau, 2016

## Figure 8 – Hypothèse de travail

L'augmentation de l'expression de DNMT3A et HSF2 favorise la formation d'un complexe HSF2-DNMT3A en réponse à l'exposition prénatale à l'éthanol. Cela peut conduire à deux situations (El Fatimy et al., 2014) :

-la liaison de HSF2 est conservée en réponse à ce stress sur certains gènes cibles. Dans ce cas HSF2 recruterait DNMT3A et la région régulatrice de ce gène serait en conséquence hyperméthylée.

-une perte de liaison de HSF2 est provoquée en réponse à ce stress, au niveau de certains gènes cibles. Dans ce cas, HSF2 séquestrerait DNMT3A, qui ne pourrait plus agir sur ses régions cibles, ce qui conduirait à une hypométhylation.

génomique, et l'expression des gènes. Nous souhaitons tester cette hypothèse de l'implication éventuelle de DNMT3A et/ou de HSF2 dans cette redistribution du méthylome.

Nous avons défini une hypothèse de travail qui considère que, HSF2 ayant des cibles spécifiques sous stress, la formation du complexe HSF2/DNMT3A serait alors responsable d'une partie de la redistribution de la méthylation observée à l'issue d'un stress (**Figure 8**) :

- Soit HSF2 recrute DNMT3A conduisant à la méthylation de gènes cibles et inhibant ainsi leur expression
- Soit HSF2 séquestre DNMT3A, empêchant ainsi sa fixation sur des gènes sur lesquels il était initialement fixé, conduisant à une hypométhylation de ceux-ci, favorisant leur transcription.

Pour tester notre modèle de travail :

- Nous souhaitons tout d'abord identifier les sites du génome différentiellement méthylés, par l'analyse de l'état de la méthylation des cytosines au sein du génome du cortex cérébral d'embryons de souris à E16.5, dans des conditions physiologiques ou de stress alcoolique prénatal.
- Parallèlement, nous souhaitons identifier les sites de fixation de HSF2 et de DNMT3A dans ces deux conditions.

Nous confronterons ensuite ces deux groupes de résultats. Parmi les régions différentiellement méthylées identifiées, la question sera de déterminer si certaines correspondent aussi à des sites de fixation de HSF2 et/ou de DNMT3A. Cela permettra d'infirmer, de confirmer et/ou de préciser notre hypothèse de travail.

Ce projet est celui d'une étudiante en thèse au sein du laboratoire, Agathe Duchateau.

Pour identifier les sites de fixation de HSF2 et DNMT3A en conditions physiologiques ou de stress dans le cortex embryonnaire, j'ai participé à la mise au point, avec elle, des expériences d'immuno-précipitation de chromatine qui seront suivies d'un séquençage à haut débit (Chromatine immunoprecipitation with *Sequencing* ou *ChIP-seq*).

Pour mettre au point et valider des expériences de *ChIP-seq*, il est utile de connaître un certain nombre de gènes cibles pour le facteur étudié.

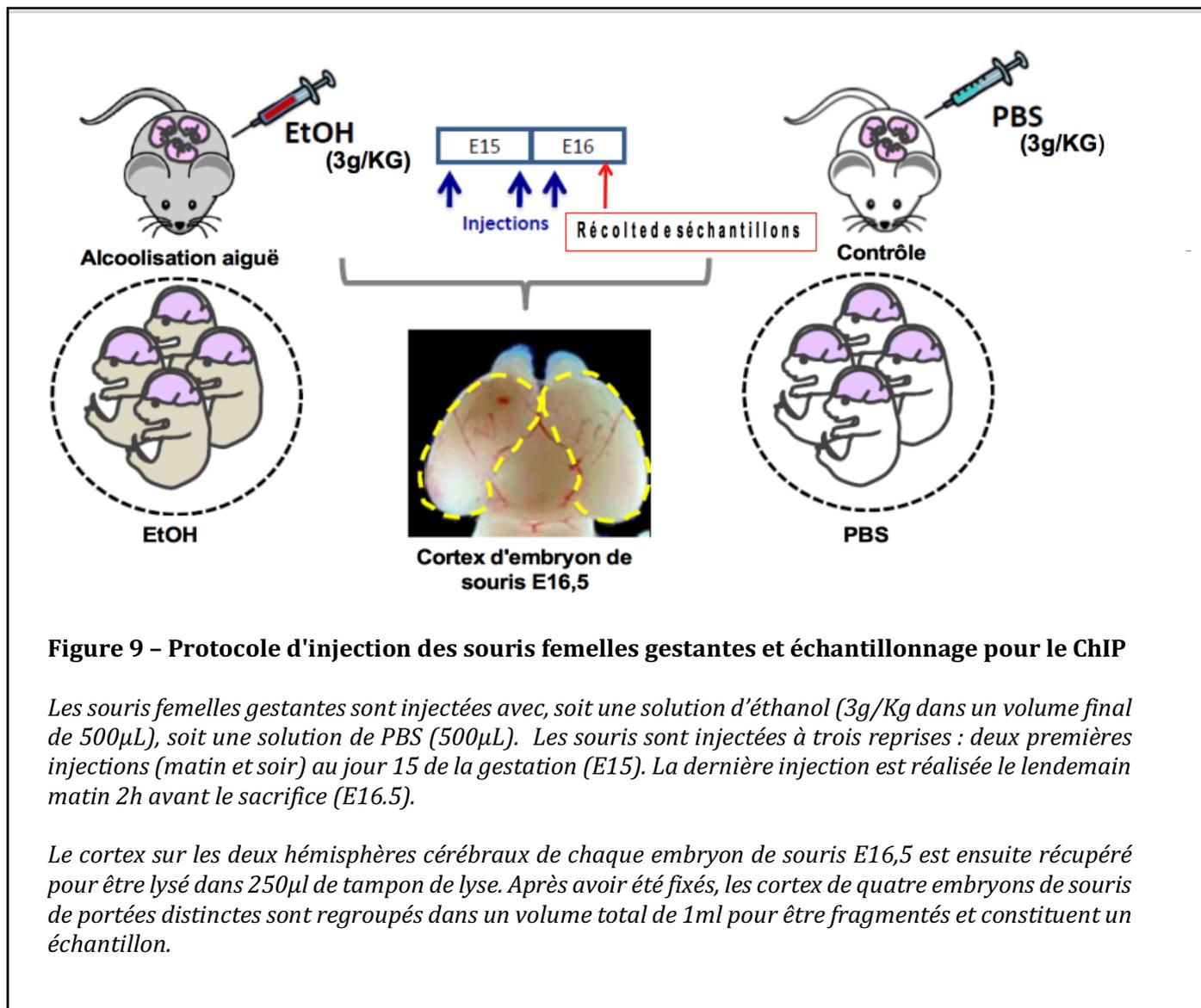
- **Pour HSF2**, l'équipe bénéficie de ses travaux antérieurs. En effet, une expérience de *ChIP-seq* ciblant HSF2 sur des cortex d'embryons de souris sauvages (C57Bl/6N), en conditions physiologiques, a permis d'identifier comme cibles de HSF2 dans ce tissu, les gènes *Nde1*, *Dcx*, *Dclk1*, *p35*, *Mid1*, *ErbB2* ainsi que les gènes *Hsp70*, et *Hsp90* (El Fatimy et al. 2014). L'équipe a montré que HSF2 fixe de façon différentielle certains de ces gènes en condition physiologiques ou d'alcoolisation fœtale (EPA)<sup>1</sup>.
- **Pour DNMT3A**, en revanche, ses cibles sont peu connues dans le cortex embryonnaire. Il est donc plus difficile de trouver un gène cible candidat pour valider les expériences.

Le matériel utilisé lors du précédent *ChIP-seq* réalisé par l'équipe n'est plus disponible (sonicateur, anticorps). Nous avons donc dû mettre à nouveau au point les conditions de sonication et d'immunoprécipitation pour les deux facteurs. Nous avons choisi d'optimiser un protocole commun à l'immunoprécipitation de HSF2 et de DNMT3A.

Ma contribution à cette analyse a donc été de participer à l'optimisation du protocole en testant différentes conditions d'extraction de la chromatine, de lyse, et de fragmentation de l'ADN par sonication, permettant de réaliser une immunoprécipitation pour chacune des deux cibles, puis de collecter et fixer les échantillons pour le séquençage.

---

<sup>1</sup> On distingue les cibles constitutives de HSF2 (comme le gène *Nde1*), des cibles différentielles. Par exemple, les gènes *Dcx* et *Dclk1* ne sont ciblés par HSF2 qu'en conditions physiologiques tandis que les gènes *Mid1* et *ErbB2* ne sont des cibles de HSF2 qu'en condition d'EPA. Enfin, la fixation de HSF2 sur les gènes *hsp70* et *hsp90* est renforcée sous EPA.



## Matériels et Méthodes

### **I. Modèle animal embryonnaire**

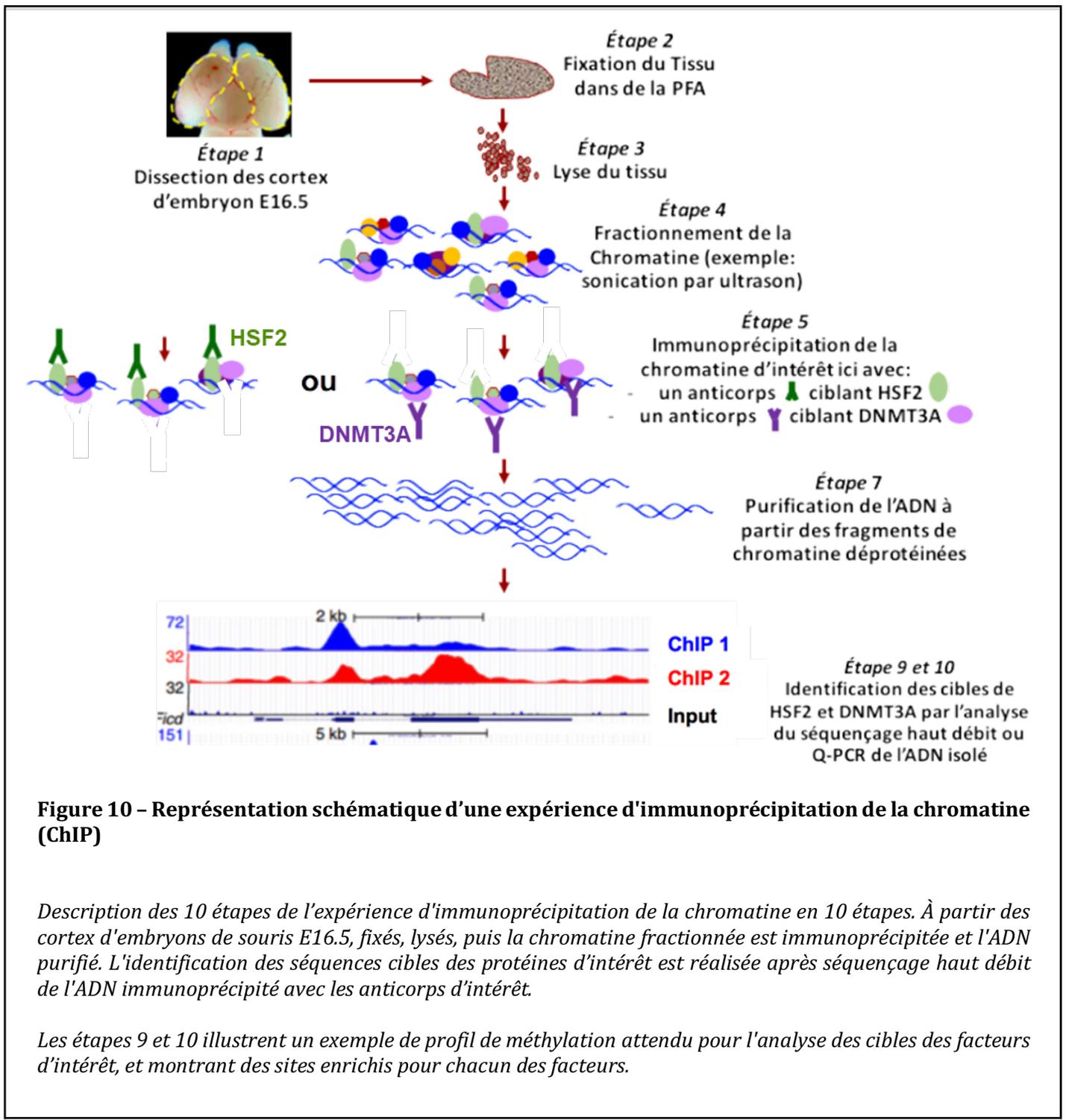
Les expériences de *ChIP-seq* sont faites sur des souris de fond génétique C57Bl/6N (sauvage ou homozygote mutant pour HSF2). Seuls les mâles sont considérés dans cette analyse afin de s'affranchir des différences de sensibilité qui sont fonction du sexe face aux stress environnementaux (Bronson et Bale 2016). Les embryons de souris sont prélevés au stade E16.5. C'est le stade embryonnaire où il y a la plus forte concentration du facteur HSF2 actif (c'est à dire sous forme acétylée) dans le cerveau. C'est également un moment de transition entre la multiplication des précurseurs neuronaux et le début de la génération des astrocytes.

### **II. Injection des souris : protocole d'alcoolisation aiguë**

Les embryons subissent un stress répété d'alcoolisation aiguë pendant la gestation (**Figure 9**), par injection intra-péritonéale des souris femelles gestantes, sauvages (WT) ou hétérozygotes (Het) pour HSF2. Elles subissent trois injections successives de 500µL de PBS (contrôle) ou d'éthanol à 3g/kg (test). Les deux premières injections se font au jour 15 de la gestation (E15) : une le matin et une le soir. La troisième injection est réalisée le lendemain matin 2h avant le sacrifice (à E16.5).

### **III. Expérience d'Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)**

Afin de mettre en évidence les conséquences du stress alcoolique sur la fixation des deux protéines d'intérêts (HSF2 et DNMT3A) sur des sites spécifiques du génome, nous souhaitons réaliser une expérience de *ChIP-seq*.



**Figure 10 – Représentation schématique d’une expérience d’immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)**

*Description des 10 étapes de l’expérience d’immunoprécipitation de la chromatine en 10 étapes. À partir des cortex d’embryons de souris E16.5, fixés, lysés, puis la chromatine fractionnée est immunoprécipitée et l’ADN purifié. L’identification des séquences cibles des protéines d’intérêt est réalisée après séquençage haut débit de l’ADN immunoprécipité avec les anticorps d’intérêt.*

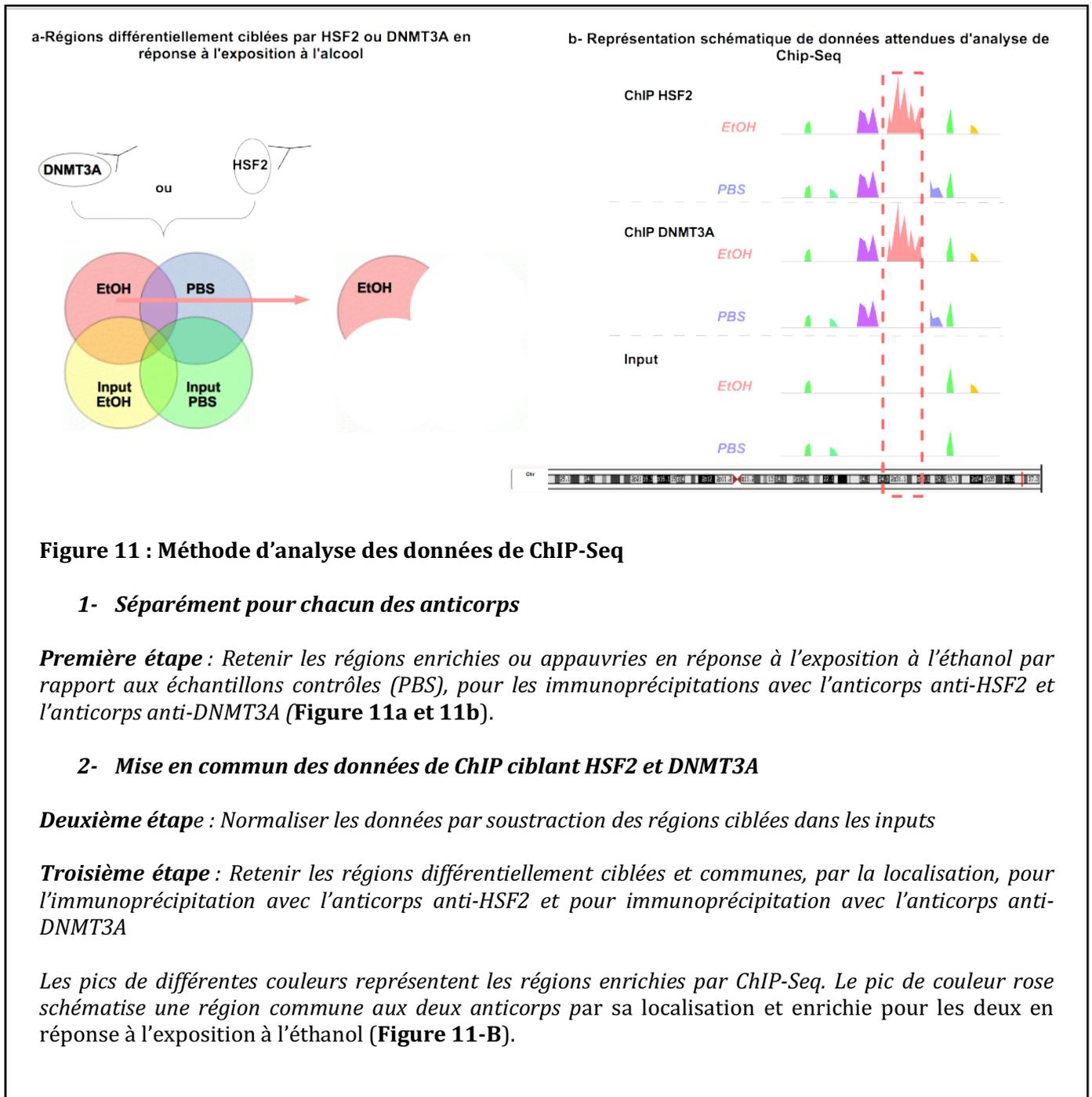
*Les étapes 9 et 10 illustrent un exemple de profil de méthylation attendu pour l’analyse des cibles des facteurs d’intérêt, et montrant des sites enrichis pour chacun des facteurs.*

Cette expérience consiste à isoler, séquencer et identifier des régions du génome sur lesquelles HSF2 et ou DNMT3A se fixent.

Cette expérience se déroule en plusieurs étapes décrites **Figure 10** :

- 1- Dissection des cortex issus d'embryons de souris de 16 jours (E16.5) dans un milieu de culture froid qui préserve les interactions moléculaires (L15, voir section **Dissection**).
- 2- Fixation des tissus dans un milieu contenant du paraformaldéhyde, pour figer les interactions moléculaires. Ainsi, si les protéines HSF2 et/ou DNMT3A fixent l'ADN en des sites spécifiques du génome, ces protéines y restent localisées.
- 3- Lyse du tissu à froid dans un tampon par des allers et retours à la pipette
- 4- Fragmentation de la chromatine en des fragments de 300 à 500 paires de bases (pdb). Nous avons choisi de faire cette fragmentation par ultrason (sonication).
- 5- Immunoprécipitation de la chromatine avec des anticorps ciblant HSF2 ou DNMT3A. Ceci permet d'isoler les fragments de chromatine contenant les facteurs d'intérêt au sein de la population de chromatine totale fragmentée.
- 6- Décrochage des protéines fixées à la chromatine immunoprécipitée.
- 7- Purification de l'ADN à partir des fragments de chromatine déprotéinée.
- 8- Séquençage de l'ADN isolé, préalablement amplifiée avec des adaptateurs adéquats.
- 9- Identification des sites sur lesquels les facteurs d'intérêts fixent l'ADN en conditions physiologiques ou d'alcoolisation fœtale. Ceci est possible grâce à l'utilisation d'outils bioinformatiques qui permettent (i) d'attribuer une localisation sur le génome à une séquence obtenue, (ii) quantifier le nombre de séquences obtenues pour un site donné.
- 10- Détermination d'un enrichissement en des séquences particulières dans les conditions testées par rapport à des conditions de référence pour chacun des facteurs d'intérêt.

Pour cette expérience de ChIP-seq, je me suis principalement attachée à optimiser les conditions de lyse des tissus (étape 3) et de sonication de la chromatine (étape 4), ainsi que les conditions d'immunoprécipitation (étapes 5 à 7).



#### IV. Définir les témoins expérimentaux

Afin de mettre en évidence les conséquences du stress alcoolique sur la fixation des deux protéines d'intérêts sur le génome, nous cherchons les régions qui sont enrichies, ou appauvries lors d'un *ChIP-Seq* ciblant HSF2 ou DNMT3A, en condition d'alcoolisation foetale par rapport au contrôle (PBS). Nous avons choisi comme situation de référence des animaux ayant subi une injection de PBS, plutôt que des animaux n'ayant pas été manipulés. En effet, l'injection des femelles gestantes est un stress en soi. Ce que nous souhaitons mettre en évidence, ce sont les effets du stress alcoolique et non les effets combinés du stress alcoolique et du stress de l'injection, c'est pourquoi nous avons fait le choix de telles conditions témoins.

Pour mettre en évidence les cibles différentielles de HSF2 et/ou DNMT3A en réponse au stress alcoolique par rapport à la situation contrôle (injection PBS), les données de séquençage à haut débit des ADN obtenus à l'issue de ces différentes immunoprécipitation, seront comparées comme dans l'exemple présenté en **Figure 11**. Afin de distinguer le signal spécifique, du bruit de fond, et de comparer les données entre elles, il est nécessaire d'une part de soustraire le signal non spécifique (bruit de fond), et d'autre part de normaliser les données entre elles.

Pour appréhender le bruit de fond, on réalise un *Input*.

L'*Input* correspond à l'ADN isolé et séquençé à partir des extraits de chromatine brut fixés, lysés, fragmentés, puis incubés avec les billes de sépharose couplées aux protéines G<sup>2</sup>. Lors du séquençage de l'*Input*, toutes les régions du génome ont donc la même probabilité d'être séquencées.

Une représentation schématique du type de résultats attendus est présentée en **Figure 11**.

---

<sup>2</sup> Cette incubation avec les billes de sépharose est le *preclearing*. Cette étape est réalisée en préalable de toute immunoprécipitation de la chromatine, elle permet de retirer les protéines qui se fixent de façon non spécifique sur les billes de sépharose.

## V. Dissection des cerveaux de souris embryonnaire E16, 5 et préparation des tissus

Les conditions de prélèvement et de fixation des cortex sont celles utilisées dans l'équipe pour les études de CHIP ciblant HSF2 au niveau de cerveau embryonnaire de souris (El Fatimy et al. 2014). Le prélèvement des cortex embryonnaires est réalisé sur la glace, dans du milieu L15 (Leibovitz, *Thermo Fisher* 11415056) à 4°C. Les embryons sont sexés et génotypés pour HSF2. La fixation se fait dans une solution de formaldéhyde à une concentration finale de 1% pendant 10min par agitation dans la glace. La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution de glycine de concentration finale de 0.125M pendant 5min en agitation dans la glace. Les lavages après glycine, se font dans un tampon de PBS+PIC (*protein inhibitor cocktail*) sans EDTA (éthylène-diamine-tétra-acétique acide).

La lyse des cerveaux d'embryons est réalisée dans la glace par des allers et retours à la pipette pendant au moins 15 minutes, d'abord individuellement chaque cerveau dans un volume de 250µl. Les cerveaux de quatre embryons mâles d'une même portée sont ensuite regroupés dans un volume total de 1ml, volume nécessaire pour la sonication.

Trois tampons de lyse ont été testés :

- **Tampon 1** : Ce tampon est celui utilisé classiquement dans l'équipe. Il est composé de : 1%SDS, 10mM EDTA (pH8), 50mM TrisHCl (pH8.1), inhibiteurs de protéases (1X) (El Fatimy et al, 2014, données supp.)
- **Tampon 2** : Il correspond au Tampon 1, avec une plus faible concentration en SDS : 0,2%SDS.
- **Tampon 3** : Ce tampon a été décrit dans une publication décrivant une expérience de CHIP avec un anticorps anti-DNMT3A de chez Abcam (ab2850) sur des cellules souches embryonnaires humaines, hESCs (Bahar Halpern, Vana, et Walker 2014). Il est composé de : 25mM TrisHCl (pH8.1), 150mM NaCl 5M, 1% NP40, 0,5% SDS, 1% deoxycholate, 1% Triton.

## VI. Protocole de fragmentation de l'ADN par ultrason

Nous avons testé deux méthodes réalisables sur le campus de l'institut de recherche (Paris Rive Gauche, PRG), pour fragmenter l'ADN par ultrasons (sonication) :

- la technologie du sonicateur Covaris,
- la technologie du sonicateur Bioruptor (Diagenode Pico).

Ils diffèrent entre eux pour plusieurs paramètres :

- 1- La méthode de propagation des ultrasons au tissu
- 2- Le volume maximal des échantillons à traiter
- 3- Le nombre d'échantillons pouvant être traités simultanément.

### 1- Propagation des ultrasons :

- L'appareil Covaris propage les ondes par le biais d'une tige fine mise au contact de l'échantillon et figée dans le bouchon de tubes spécifiques
- L'appareil Diagenode Pico propage les ondes par le biais de billes placées dans le tube, au contact de l'échantillon.

### 2- Volume maximal des échantillons à traiter :

- L'appareil Covaris nécessite un volume d'échantillon à traiter de 130µL exactement
- L'appareil Diagenode Pico autorise des volumes d'échantillons entre 300µL et 1mL lorsque l'on réalise une sonication avec billes.

### 3- Le nombre d'échantillons pouvant être traités simultanément :

- L'appareil Covaris ne permet de traiter qu'un échantillon à la fois
- L'appareil Diagenode Pico permet de traiter jusqu'à 6 échantillons simultanément

Pour que les résultats de l'expérience de *ChIP-seq* soient le plus précis possible, il est nécessaire que la chromatine soniquée présente des fragments d'ADN de 300 à 500pb et que les épitopes reconnus par les anticorps ciblant DNMT3A ou HSF2 soient préservés.

Pour cela plusieurs temps de sonication ont été testés avec les deux appareils.

La qualité de fragmentation est testée sur gel d'agarose. Pour cela l'ADN est préalablement isolé de la chromatine fragmentée :

- Les protéines sont retirées de la chromatine par un traitement à la protéinase K (concentration finale= 20mg/ml) pendant 45 min à 55°C et une incubation toute la nuit à 65°C

- L'ADN subit une purification au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol

- Une fraction de cet ADN purifié subit un traitement à la RNase A (10µg/mL) à 37°C pendant 30 minutes.

- L'ADN des différents échantillons est dosé au Denovix

Le profil de sonication d'une fraction de la chromatine est alors vérifié sur gel d'agarose à 1,8% par électrophorèse longue (2h/40v).

Nous avons testé deux temps de sonication avec l'appareil Covaris (4 et 6 minutes/ 15" Off/ 15" On) et 6 temps de sonication avec l'appareil Diagenode (1 ; 2 ; 5 ; 7 ; 8 ou 10 minutes/ 30" Off/ 30" On). Pour cette technologie nous avons parallèlement testé deux quantités de billes de sonication (Graduation à 1 ou à 2 pour un volume de 1mL).

## VII. Conditions de l'immunoprécipitation de la chromatine

Chaque échantillon destiné aux immunoprécipitations est préparé pour obtenir 30µg de chromatine. Un échantillon est réalisé à partir de la sonication de chromatine des cerveaux des mâles d'une même portée (une portée représente un échantillon). Les immunoprécipitations de ces échantillons sont réalisées en simultané avec HSF2 et DNMT3A.

### Préparation des échantillons témoins *Inputs* :

10% de la chromatine brute fixée, lysée et soniquée est traitée à partir de 30µg de chromatine, par incubation du lysat avec les billes de sépharose couplées avec les protéines G, dans la solution tampon de l'immunoprécipitation (*preclear*).

Tampon de l'immunoprécipitation :

- NaCl 150mM
- Tris-HCL (pH8) 20mM
- Triton-X 1%
- EDTA (pH8) 1mM
- Inhibiteur de protéase

### Préparation des échantillons test :

Pour les immunoprécipitations avec l'anticorps HSF2 deux anticorps sont utilisés dans l'équipe :

- Un anticorps monoclonal de chez Abcam (3E2)

- Un anticorps polyclonal issu de sérum de lapin H57 (Laboratoire de Lea Sistonen, Turku, Finlande).

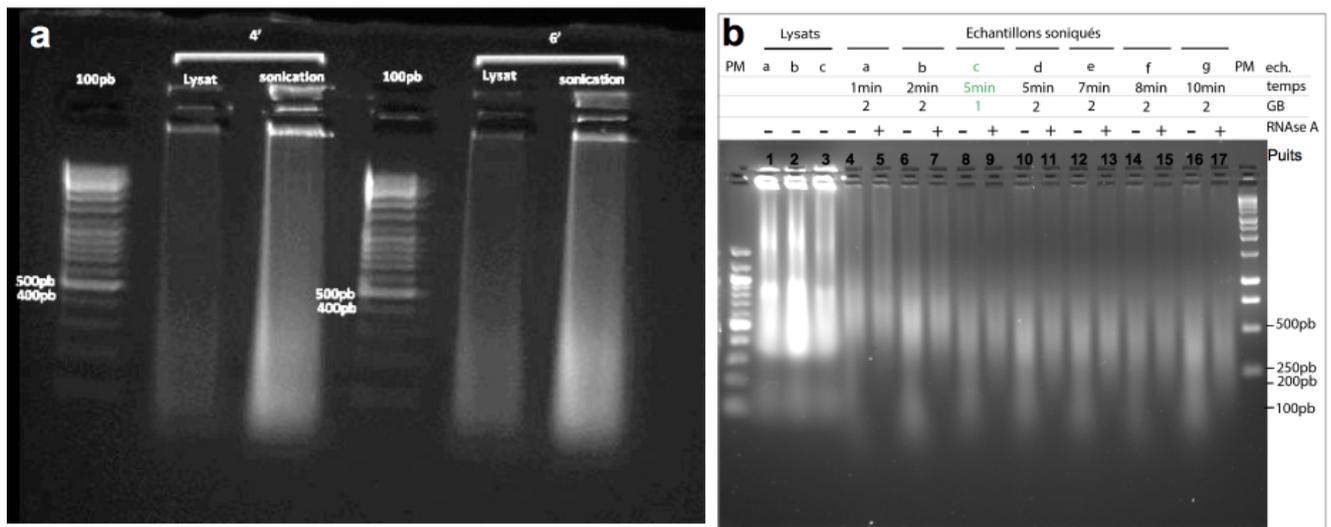
Pour les immunoprécipitations avec l'anticorps DNMT3A, l'équipe utilise :

- L'anticorps Novus 64B1446
- L'anticorps Abcam (ab2850)

Le protocole de CHIP nécessitait d'être optimisé pour deux aspects distincts :

- permettre d'immunoprécipiter HSF2 et DNMT3A à partir d'un même échantillon de chromatine, soit un tissu unique fixé, lysé et soniqué dans des conditions à déterminer.

- déterminer l'anticorps optimal pour une immunoprécipitation de chacun des facteurs, à partir d'un échantillon préparé dans ces conditions de lyse et de sonication, parmi ceux dont dispose l'équipe.



**Figure 12 – Profil de sonication des échantillons utilisant l'appareil Covaris, ou l'appareil Diagenode.**

**(a)** Electrophorèse sur gel d'agarose 1,8%, de l'ADNg non fragmenté (lysats), ainsi que de l'ADNg purifié des échantillons soniqués. Sonication réalisée au Covaris (**Figure 12a**), en testant deux temps différents (4 et 6 minutes). Dépôt de 10 $\mu$ l d'échantillon par puits (environ 200ng). Le profil des lysats est différent des échantillons fragmentés. Pour les deux temps les échantillons sont fragmentés en dessous de 500pb.

**(b)** Profil de sonication des échantillons fragmentés au Diagenode (**Figure 12b**), avec différentes conditions de temps (1, 2, 5, 7, 8 ou 10 min), différentes quantités de billes (GB1 ou GB2), et avec ou sans traitement RNase. Le profil des lysats est différent des échantillons fragmentés. Le profil de sonication est proche de 500pb à partir de 5min. Il n'y a pas de différences du profil de sonication entre les graduations de billes 1 ou 2 à 5min de sonication.

**(a-b)** Les conditions de sonication retenues pour l'utilisation du Diagenode sont indiquées en vert. Ech : échantillon ; **GB** : graduation de billes de sonication ; **PM** : marqueurs de poids moléculaires.

## Résultats

### I. Profil de sonication

Le séquençage haut débit de la chromatine résultant des expériences de ChIP, exige que l'ADN soit fragmenté en moyenne autour de 500pb. Le séquençage à haut débit n'est pas possible sur des fragments de trop petites tailles (ni de taille supérieure à 500pdb), mais de trop grands fragments donnent des résultats moins précis.

J'ai testé différents temps de sonication, avec la technologie du Covaris ou Diagenode Pico pour l'obtention de fragments entre 300pb et 500pb.

#### 1- Sonication avec l'appareil Covaris :

La migration sur gel d'agarose de l'ADN non fragmenté (lysate) et de l'ADN fragmenté, montre deux profils différents alors que la même quantité d'ADN purifié est déposée :

- l'intensité des bandes est moins forte pour le lysate par rapport à l'échantillon soniqué, ce qui montre que la dispersion des bandes de différentes tailles est homogène dans le lysate, alors qu'il est concentré à certains poids moléculaires dans l'échantillon soniqué.
- l'intensité des bandes de tailles inférieures à 500pb est plus forte dans l'échantillon soniqué par rapport au lysate.

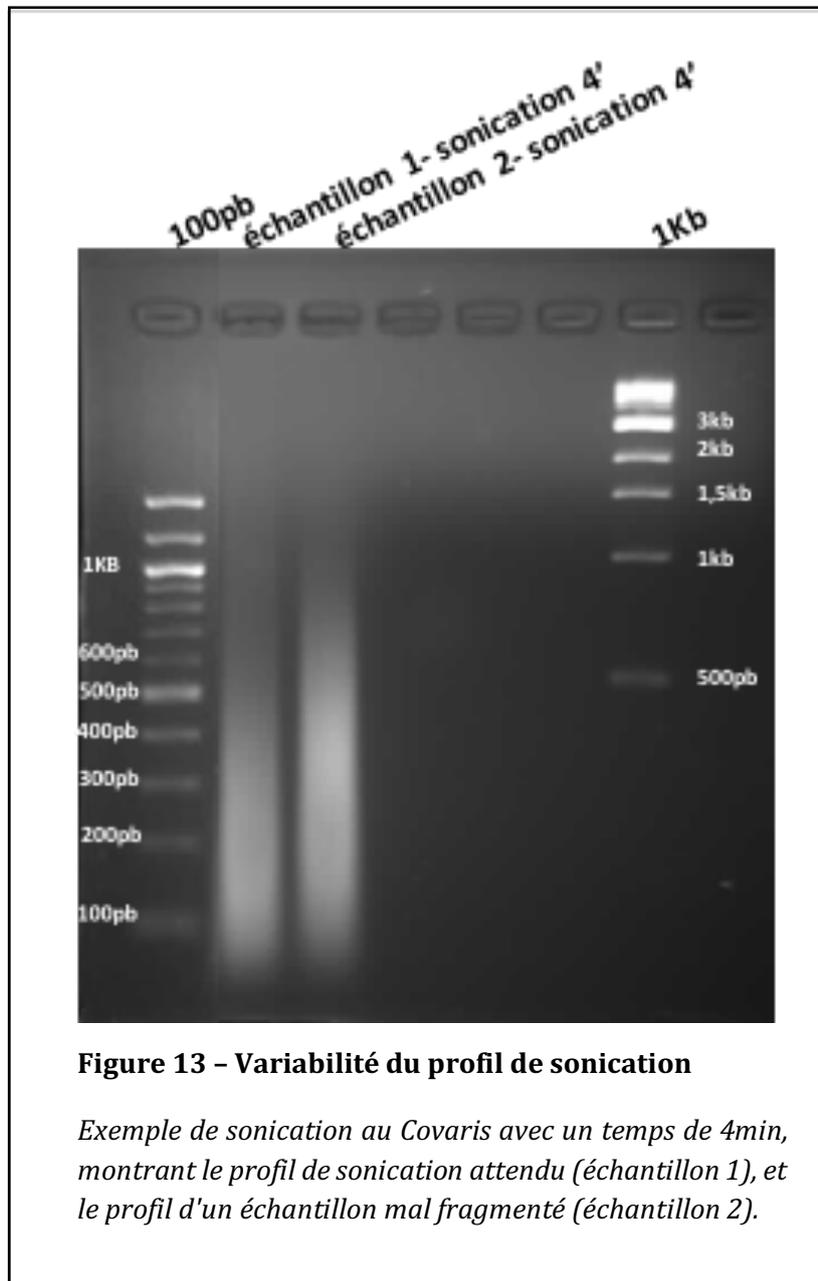
Ceci indique que la sonication est satisfaisante aussi bien après 4min que 6min de sonication. La sonication étant délétère pour la qualité de la préservation des épitopes, nous avons considéré que la sonication pendant 4 min avec l'appareil Covaris était donc optimale (**Figure12a**).

#### 2- Sonication avec l'appareil Diagenode Pico :

Avec cet appareil nous avons testé à la fois le temps de sonication et la quantité de billes déposées dans l'échantillon pour la fragmentation.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée à partir :

- des acides nucléiques purifiés à partir des lysats de tissus non soniqués.
- des acides nucléiques purifiés à partir de la chromatine soniquée.
- de l'ADN purifié à partir de la chromatine soniquée et traitée à la Rnase soit ribonucléase soit RNase.



L'électrophorèse montre :

- l'ADN des lysats non soniqués présente des fragments de haut poids moléculaires (au-delà de 1,5kb puits n°1 à 3).

- après sonication de 1 ou 2min, avec des billes graduation 2, des fragments de haut poids moléculaires persistent (puits 4 à 7).

- après sonication de 5 min, quelle que soit la graduation de billes, on ne détecte plus de fragments de haut poids moléculaires (puits 8 à 11), à part dans le puits 10 qui est un échantillon traité sans Rnase.

- Avec une graduation de bille de 2, seule une sonication de 10min permet d'obtenir une majorité de fragments d'ADN de tailles inférieures à 500pdb (puits 17).

- le traitement RNase permet de voir de façon plus précise les petits fragments d'ADN qui sont masqués en présence d'ARN, et d'éliminer les complexes de haut poids moléculaire qui ne migrent pas dans le gel (puits 10,12,14, et 16).

Pour obtenir des fragments suffisamment petits avec l'appareil Diagenode Pico il est donc nécessaire de réaliser une sonication d'au moins 10min avec une graduation de billes de 2 (**Figure 12b**).

Lors de nos tests de sonication nous avons observé une certaine variabilité dans nos profils de sonication pour deux conditions supposées identiques. Dans l'exemple présenté **Figure 13** deux échantillons correspondant chacun à 2 cortex embryonnaires lysés puis soniqués pendant 4 min, nous observons des profils de migration différents :

- l'échantillon 1 présente une majorité de fragments d'ADN de tailles inférieures à 500pdb)

- l'échantillon 2 présente une majorité de fragments d'ADN de tailles inférieures à 1kb).

Nous avons pris comme postulat que les appareils Covaris et Diagenode Pico étaient peu variables. Nous avons considéré que la variabilité que nous observons est due soit aux conditions de fixation, soit aux conditions de lyse. Nous avons donc choisi de les tester. J'ai participé aux tests de lyse que j'ai décrit ci-dessous.

## II. Conditions de lyse

Nous souhaitons réaliser les ChIP ciblant HSF2 et DNMT3A à partir des mêmes chromatines soniquées. Il faut donc identifier des conditions de lyse et de sonication acceptables pour les deux immunoprécipitations.

Les ChIP ciblant HSF2, réalisées précédemment dans l'équipe sur des cortex embryonnaires étaient réalisées à partir d'un tampon de lyse contenant 1% de SDS. Une concentration importante en SDS permet une meilleure sonication de la chromatine, mais est susceptible d'endommager les épitopes, d'où la nécessité de trouver le bon compromis entre ces deux paramètres.

Une concentration en SDS de 1% est élevée, comparée aux conditions classiques de ChIP. Elle se justifie lorsque l'on cible des protéines ancrées profondément dans les complexes chromatinien. Pour réaliser la ChIP elle-même il est alors nécessaire de diluer la chromatine de façon à limiter la concentration en SDS (pour atteindre au moins 0,1% SDS). Dans les rares articles présentant des ChIP ciblant DNMT3A, la concentration en SDS dans le tampon lyse est de 0,2% SDS.

Nous avons donc choisi de tester 3 conditions de lyse :

- une dans le tampon classiquement utilisé dans l'équipe pour des ChIP ciblant HSF2 (nous l'avons nommé tampon 1), (El Fatimy et al. 2014).
- une dans le tampon 1 modifié qui diffère du tampon 1 uniquement pour sa concentration en SDS, réduite ici à 0,2% (nous l'avons nommé tampon 2)
- une dans un tampon décrit pour les ChIP ciblant DNMT3A avec un anticorps provenant de chez Abcam (nous l'avons nommé tampon 3), (Bahar Halpern, Vana, et Walker 2014).

Pour vérifier la conservation des épitopes après les immunoprécipitations que nous avons réalisées en fonction de ces différents tampons, des Western Blot ont été faits avant et après sonication, et également après immunoprécipitation (données de Aurélie de Thonel).

Cette expérience montre qu'on détecte les protéines HSF2 et DNMT3A à des niveaux équivalents avec le tampon 1 et le tampon 2, ceci indique que ces conditions n'endommagent pas les épitopes cibles des anticorps DNMT3A et HSF2 utilisés.

En revanche, l'immunoprécipitation des échantillons lysés avec le tampon 3 est bien moins élevée pour les deux protéines. Ceci suggère que la lyse, ou la sonication est moins bonne avec ce tampon 3, ce qui conduit soit à une mauvaise extraction protéique, soit à une altération des épitopes ciblés par les anticorps utilisés. Dans les deux cas le tampon 3 ne permet pas une bonne accessibilité des protéines pour les anticorps.

Ainsi le tampon 1, classiquement utilisé par l'équipe semble adapté pour la lyse de cortex embryonnaire et la sonication de la chromatine pour une immunoprécipitation ciblant HSF2 ou DNMT3A.

### **III. Immunoprécipitation avec les anticorps anti-HSF2 et anti-DNMT3A**

La chromatine fragmentée est utilisée pour récupérer les fragments sur lesquels les facteurs HSF2 ou DNMT3 sont fixés. Pour cela, on réalise une immunoprécipitation avec des anticorps dirigés contre ces deux protéines. J'ai testé des immunoprécipitations avec les anticorps H57, anticorps polyclonal issu d'un sérum de lapin immunisé contre la protéine HSF2 (Laboratoire de Lea Sistonen, Turku, Finlande), et l'anticorps polyclonal de lapin Abcam (ab2850) dirigé contre DNMT3A, dans les mêmes conditions. J'ai réalisé ces expériences sur six échantillons contrôles PBS (une portée représente un échantillon, n=6), et quatre échantillons d'animaux exposés à l'éthanol (n=4) pour chacun des anticorps.

A l'issue de l'immunoprécipitation, nous obtenons des quantités d'ADN raisonnables et homogènes. Sur 7 expériences de ChIP nous avons obtenu en moyenne 14ng d'ADN pour chacun des deux anticorps avec une quantité minimale et maximale comprise entre : [4 ng et 32 ng] pour HSF2, et entre [5 ng et 25 ng] pour DNMT3A. L'immunoprécipitation semble donc fonctionner pour les deux anticorps dans les conditions que nous avons choisies.

Il est nécessaire de produire à partir de ces immunoprécipitations 20ng d'ADN par échantillon pour le séquençage haut débit. Il est donc nécessaire de poursuivre les expériences de ChIP pour collecter suffisamment d'ADN pour les échantillons en dessus de 20ng, afin de les envoyer au séquençage.

Cependant, les échantillons collectés ont subi une décongélation malencontreuse (défauts des congélateurs -80°C), et l'ensemble de ces échantillons ont été perdus. Je n'ai donc pas pu poursuivre la production de ces échantillons pour des raisons de délais, afin d'obtenir la quantité d'ADN nécessaire au séquençage, compte tenu des contraintes de temps qu'impliquent l'obtention de portées de souris et la réalisation de mon projet EPHE.

Ces expériences ont été reprises par Agathe Duchateau, étudiante en thèse dans l'équipe, avec qui j'ai poursuivi certaines mises au point du protocole avant de recentrer mon projet sur la caractérisation physiologique et morphologique de l'expression du facteur HSF2 chez la souris adulte.

## Conclusions et discussions

Mon but était d'optimiser un protocole de ChIP à partir de cortex embryonnaire permettant d'identifier à partir d'une même chromatine fragmentée les cibles de fixation des protéines HSF2 et DNMT3A, au sein du génome dans des conditions d'alcoolisation foétale ou physiologiques.

Un protocole de ChIP-seq ciblant HSF2 avait déjà été optimisé dans l'équipe, mais deux paramètres principaux avaient changé :

- l'appareil à ultra-sons disponible
- l'anticorps ciblant HSF2 (3E2) n'était plus commercialisé à une concentration élevée (200ng/ $\mu$ L).

J'ai donc dû tester de nouvelles conditions de sonication et d'immunoprécipitation.

Par ailleurs la contrainte d'immunoprécipiter la chromatine ciblant DNMT3A dans les mêmes conditions que pour immunoprécipiter la chromatine ciblant HSF2 m'a obligée à tester de nouvelles conditions de lyse.

J'ai identifié les conditions optimales de sonication avec l'appareil Covaris (4 min) et celle qui conviennent pour une sonication avec l'appareil Diagenode Pico (10 min, graduation des billes 2).

Nous avons trouvé qu'il était extrêmement contraignant de travailler avec l'appareil Covaris. En effet, il nécessite d'avoir un échantillon de 130 $\mu$ L et on ne peut fragmenter qu'un échantillon à la fois. Or, pour lyser correctement les cerveaux, il est nécessaire de les lyser dans un volume de 500 $\mu$ L par cortex.

Par opposition, nous avons montré que l'appareil Diagenode Pico permet de soniquer 2 cortex en même temps dans un tube unique, et 6 échantillons différents peuvent être traités ensemble. Il nous a semblé plus rapide, moins contraignant et plus reproductible de travailler avec l'appareil Diagenode Pico, d'autant que les expériences de *western blot* ont montré que les épitopes reconnus par les anticorps à notre disposition (ciblant HSF2 et DNMT3A) étaient préservés dans nos conditions (données non montrées de Agathe Duchateau).

J'ai participé à la définition des conditions optimales de lyse et d'immunoprécipitation.

- une lyse dans le tampon initialement utilisé dans l'équipe (avec 1% de SDS) est acceptable pour rendre accessible DNMT3A et HSF2

- les anticorps anti-DNMT3A (Abcam ab2850) et anti-HSF2 (sérum de lapin H57) reconnaissent leurs cibles dans le tampon choisi.

Pour poursuivre la mise au point du protocole de ChIP il est nécessaire de vérifier que les cibles connues de HSF2 et de DNMT3A sont bien enrichies dans la ChIP réalisée, puisque pour l'instant nous avons juste récupéré de l'ADN ; il est donc nécessaire de vérifier sa spécificité. Pour cela, des analyses de cet ADN par q-PCR (ou PCR en temps réel) seront réalisées, pour vérifier que l'on amplifie des régions cibles connues de HSF2 ou DNMT3A. Parmi les cibles connues, HSF2 cible le promoteur du gène *p35* dans le cerveau embryonnaire murin en conditions physiologiques, et il se détache de sa cible lors d'un stress alcoolique (Chang et al. 2006)

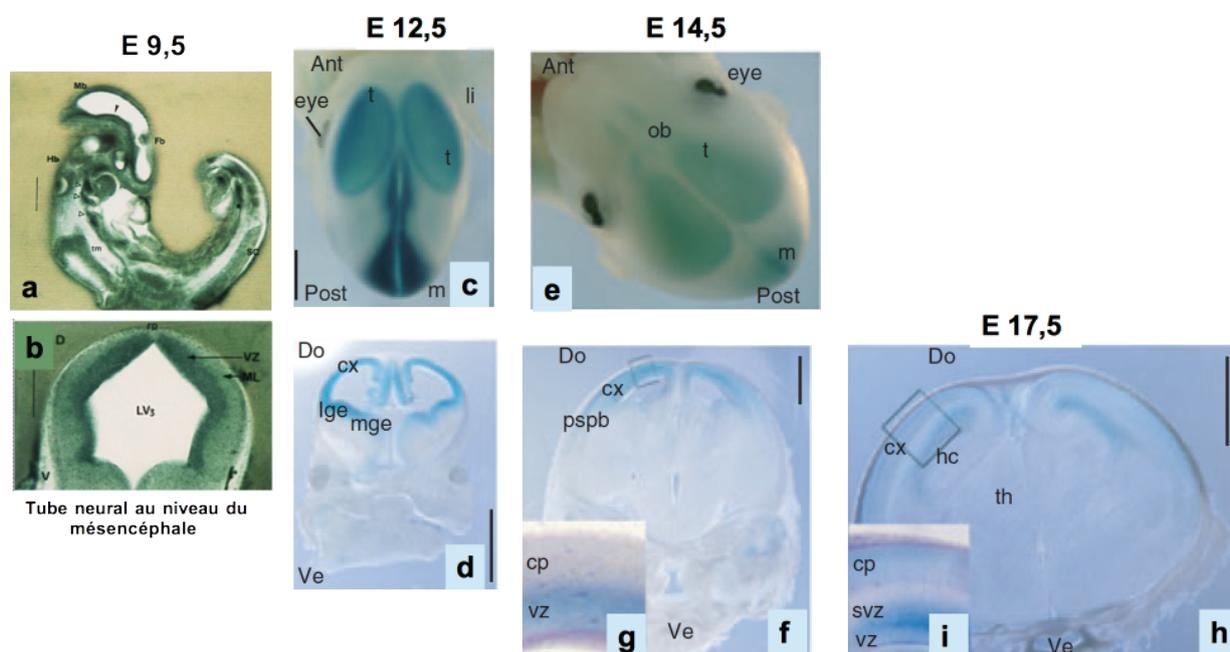
Inversement, HSF2 cible le promoteur du gène *HSP70* lors d'un stress alcoolique (El Fatimy *et al.* 2014).

Ces cibles sont donc des cibles de choix pour identifier un enrichissement différentiel entre des conditions de stress alcoolique ou de simple injection de PBS à l'issue d'une ChIP ciblant HSF2.

De même les gènes *Dlx2* et *Nestin* sont des cibles potentielles de DNMT3A, respectivement en condition de stress ou physiologiques (Chen et Chan 2014; Feng et al. 2005).

## **Chapitre II**

### **Caractérisation des défauts morphologiques et neuronaux du mutant HSF2 adulte en condition physiologique**



**Figure 14 – Expression du gène *Hsf2* à différents stades de développement**

**(a-b)** Hybridation In Situ sur un embryon total au stade E9.5, avec une sonde anti-sens spécifique de l'ARNm de *hsf2*, et couplée à la digoxigénine, soit en coupe sagittale. Barres d'échelle = 500µm. **(a)** soit en coupe coronale au niveau du mésencéphale **(b)**.

**(c-i)** Marquage beta-galactosidase aux stades E12.5, E14.5, et E17.5, suivant l'expression du gène *Hsf2*, par la détection d'une protéine de fusion HSF2/βGAL. La protéine de fusion est obtenue par recombinaison homologue au niveau de l'exon 5 du gène *Hsf2* d'une construction gène rapporteur LacZ-neomycine, introduit par Knock-In. Barres d'échelle = 1mm

Vu du marquage sur des coupes coronales **(d, f, h)**, montrant l'expression de HSF2 spécifiquement dans des régions du système nerveux. Expression de HSF2 dans le tube neural à E12.5 **(c)**, dans le télencéphale à E14.5 **(e)**, au niveau de la zone ventriculaire **(d)**, qui est une région de prolifération des neurones. L'expression de HSF2 diminue dans la région ventriculaire à partir de E15.5, et il est ensuite principalement exprimé dans la zone sous ventriculaire, comme le montre la coupe coronale au stade E17.5 **(h, i)**. D'après la figure 4 de l'article Rallu et al 1997, et la figure 3 de l'article Abane, et al 2010.

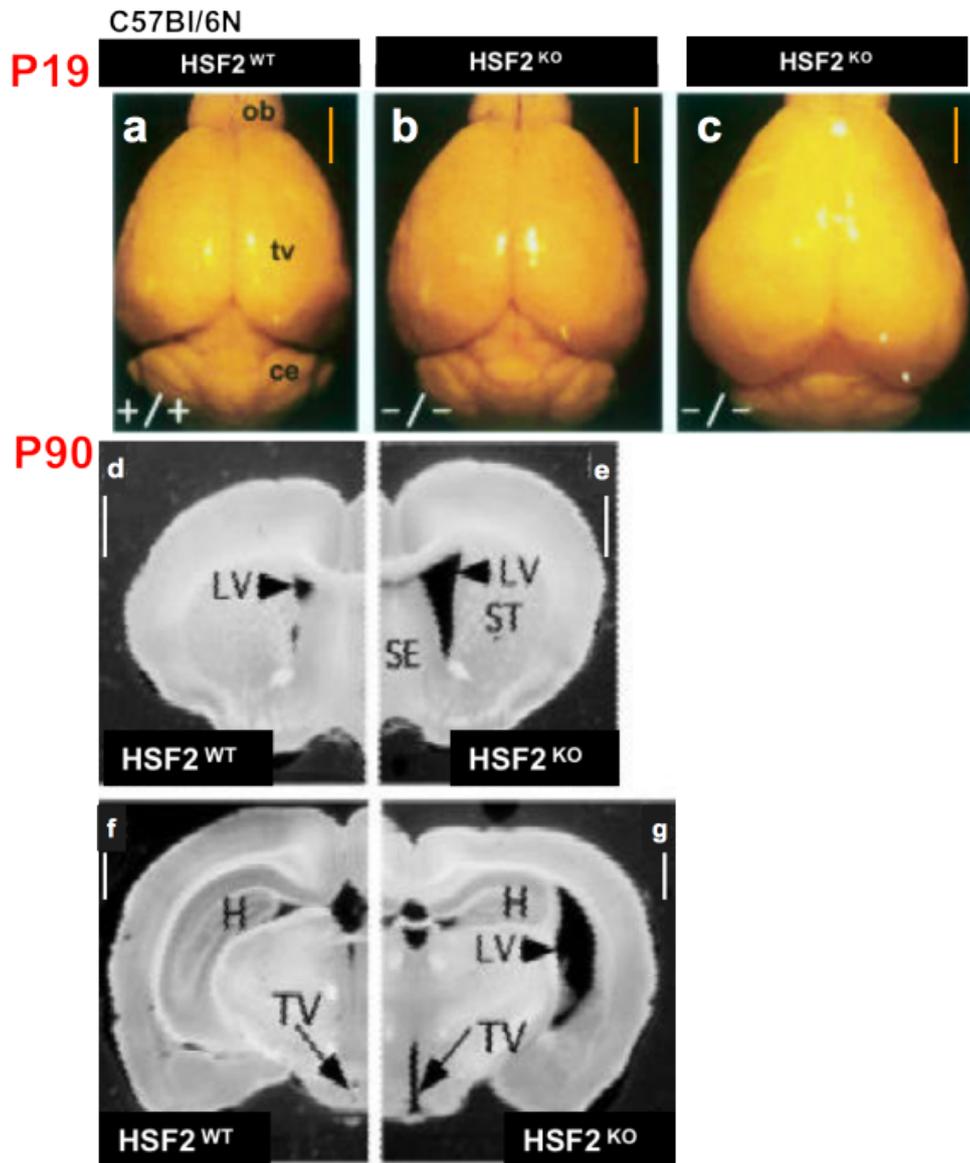
# Chapitre II - Caractérisation des défauts morphologiques et neuronaux du mutant HSF2 adulte en conditions physiologiques

## Introduction

### I. Rôle majeur du facteur HSF2 dans le cerveau embryonnaire

*Hsf2* s'exprime dans le cerveau embryonnaire dès les stades précoces (à partir de E9.5, **Figure 14**). Son expression au cours des premiers stades est ubiquitaire à part dans le tissu mésenchymateux (Rallu et al. 1997). Il a été montré à partir d'expériences d'immunohistochimie, qu'à partir du 12<sup>ème</sup> jour de la gestation (E12.5), son expression est majoritairement localisée dans les régions du système nerveux. Jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour de la gestation (E14.5), *Hsf2* s'exprime dans le tube neural au niveau du télencéphale. C'est plus précisément dans la zone ventriculaire, qui est une région proliférative, que se situe son expression ; là où se trouvent les cellules mitotiques actives, il y a encore très peu de neurones post-mitotiques à ce stade du développement (Abane et Mezger 2010). A partir du stade E15.5, son expression est localisée davantage dans la zone sous ventriculaire que dans la zone ventriculaire où son expression diminue. *Hsf2* s'exprime aussi à partir de E15.5 dans les couches supérieures du cortex (Rallu et al. 1997; Abane et Mezger 2010).

Des immunomarquages spécifiques de la préplaque corticale chez l'embryon de souris *Hsf2 KO* montrent que cette structure n'est pas affectée par l'absence de HSF2 au stade E13.5, mais qu'elle est altérée à partir du stade E15.5 (Chang et al. 2006). Ceci indique que HSF2 n'est pas impliqué dans les premiers stades de la corticogénèse. Ces données



Kallio *et al*, 2002

### Figure 15 - Phénotype du cerveau des souris *Hsf2* KO

(a-c) Panneaux du haut, à P19, les souris *Hsf2* KO ont un phénotype de pénétrance incomplète ; c'est-à-dire qu'en absence du gène *Hsf2* (b,c) les cerveaux de souris montrent des défauts morphologiques plus ou moins marqués. Chez les souris *Hsf2* <sup>-/-</sup> les plus affectées (c), les hémisphères sont aplatis au niveau du cortex, par rapport aux souris moins affectées (b), ou sauvage (a).

(d-g) Panneaux du bas, à P90, par rapport au WT (d, f), les coupes de cerveaux de souris *Hsf2* <sup>-/-</sup> montrent un striatum réduit (e), et des ventricules latéraux élargis (e,g); les hippocampes sont également réduits, et le troisième ventricule est élargi (g)

Barres d'échelle= 1mm

concordent avec le fait que *Hsf2* ne s'exprime dans la préplaque qu'à partir du stade E15.5. Il s'exprime dans la zone ventriculaire et sous-ventriculaire qui produit les neurones post-mitotiques. Lorsque *Hsf2* n'est pas exprimé au cours du développement du cerveau murin, des défauts structuraux apparaissent au niveau de la préplaque corticale, ce qui empêche la formation de la sous-plaque corticale. Ceci conduit à une morphologie anormale du cortex embryonnaire, ce qui montre que HSF2 est essentiel à l'organisation du cortex au cours du développement dès le stade E15,5.

## II. Expression et rôle du facteur HSF2 chez l'adulte

La présence du facteur HSF2 sous sa forme active (capacité de liaison à ses séquences cibles sur l'ADN) au cours du développement, et son rôle majeur chez l'embryon sont déjà bien établis. Chez l'adulte, *Hsf2* reste également exprimé dans différents organes. Le gène *Hsf2* est exprimé dans les testicules et la protéine est trouvée sous sa forme active, où elle joue un rôle dans la spermatogenèse (Sarge et al. 1994; Abane et Mezger 2010). Son expression a été mise en évidence dans d'autres organes comme l'intestin, le colon, le cœur, les reins, et le cerveau. Cependant, à part pour les testicules, HSF2 ne semble pas jouer un rôle de régulateur transcriptionnel majeur chez l'adulte. Il a été montré qu'il ne fixe pas l'ADN dans les reins ou encore dans le cerveau adulte en conditions physiologiques (Morrison, Rush, et Brown 2000).

Sans l'avoir quantifié, l'équipe a décrit des défauts anatomiques et structuraux du cerveau chez des souris adultes dont l'expression de *Hsf2* a été inactivée (Kallio et al. 2002a; Chang et al. 2006). Ces altérations morphologiques révèlent chez les animaux qui n'expriment pas *Hsf2*, des hémisphères aplatis au niveau du cortex par rapport aux animaux sauvages. Les hippocampes chez ces animaux sont réduits, ce qui conduit à une taille des ventricules plus importante que chez les individus sauvages. Néanmoins, on a pu observer que les souris *Hsf2* *-/-* présentent des phénotypes variables (de très affectés à peu affectés), la mutation induit donc un phénotype de pénétrance incomplète (Kallio et al. 2002b). On observe par exemple, parfois des hémisphères aplatis, des ventricules élargis ou encore des ventricules de tailles réduites par rapport aux souris sauvages (**Figure15**).

Les défauts structuraux du cerveau, qui ont été identifiés chez les souris *Hsf2 KO* adultes, par l'équipe, pourraient donc être les conséquences et/ou :

- Des défauts développementaux déjà caractérisés chez l'embryon *Hsf2 KO*
- D'un rôle physiologique, pas encore identifié de HSF2 dans les neurones qui expriment *Hsf2* chez l'adulte

Dans le cerveau adulte, des données de transcription *ENCODE*<sup>3</sup>, montrent que *Hsf2* est exprimé dans de nombreuses structures comme le cervelet, le lobe frontal, et le cortex. Pour mieux comprendre l'implication physiologique de HSF2, notre équipe s'intéresse à des structures particulières du cerveau pour identifier si elles sont altérées ou non par l'absence du facteur HSF2 chez l'adulte. Mon projet a donc été d'affiner la caractérisation de ces défauts morphologiques et de les quantifier. Plus globalement, ces études visent à identifier les éventuelles conséquences neuropathologiques liées à l'absence du facteur HSF2.

### III. Effet de l'absence de HSF2 sur le comportement d'addiction

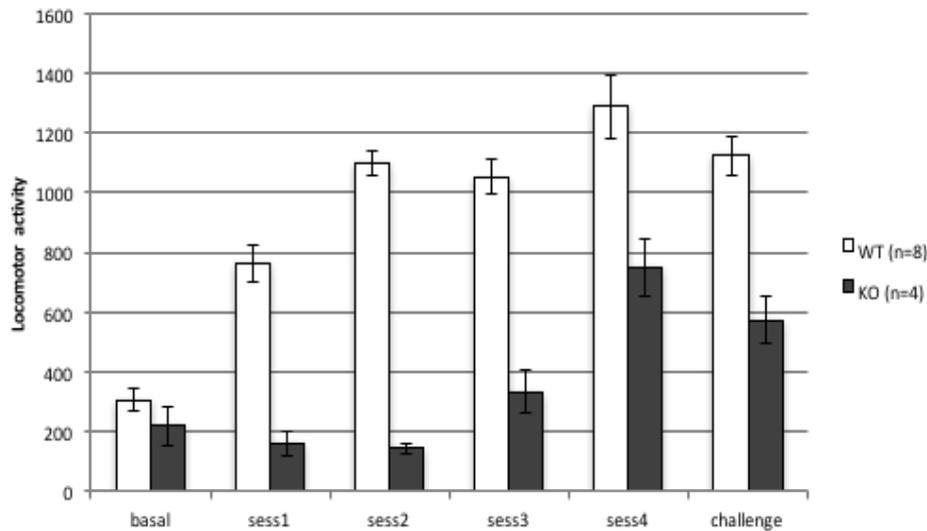
Les mécanismes d'addiction sont contrôlés dans le cerveau par les circuits de récompense qui sont eux-mêmes sous le contrôle d'un neurotransmetteur : la dopamine. Lorsque l'organisme est soumis à des substances addictives telles que des drogues ou de l'alcool, de la dopamine est libérée en grande quantité par l'aire tegmentale ventrale (**Figure 3**). C'est la région du cerveau qui produit et distribue la dopamine dans les circuits mésocorticolimbique qui comprennent de nombreuses régions du cerveau, dont le cortex préfrontal, le striatum et le noyau accumbens.

La dopamine est un neurotransmetteur catécholaminergique, qui joue un rôle modulateur des transmissions dans le cerveau, elle est impliquée dans la sensation de bien-être et de motivation. La libération de la dopamine au niveau du noyau accumbens régule les processus de motivation et facilite le renforcement de certains apprentissages. Une

---

<sup>3</sup> <http://www.encodeproject.org/>

### Locomotor response to amphetamine (2mg/kg)

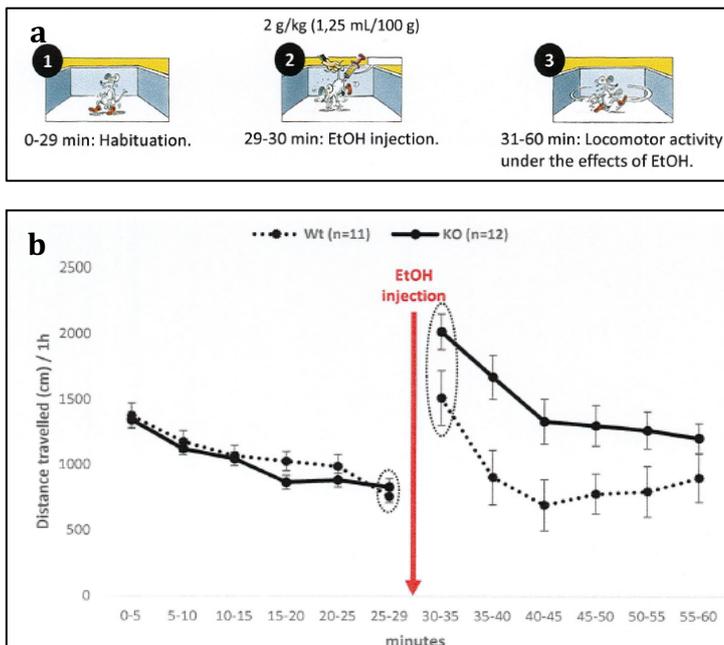


**Figure 16 – Réponse locomotrice à l'exposition aux amphétamines**

Les animaux reçoivent une injection d'amphétamine 4 jours consécutifs, puis leur activité locomotrice est mesurée. En condition normale, il y a une augmentation progressive de l'activité locomotrice montrant la sensibilisation à l'amphétamine. Après une période de repos, les animaux reçoivent à nouveau une injection et on s'attend à un maintien de la réponse haute à l'amphétamine comme preuve de la mémoire de cette sensibilisation (barres blanches)..

Les animaux Hsf2 KO (barres noires) se sensibilisent moins vite à l'amphétamine que les animaux WT, et leur sensibilisation est moins importante. (Résultat d'une collaboration avec Jean-Pol Tassin, IBPS, Paris)

**Figure 17 – Réponse locomotrice à l'exposition à l'éthanol**



(a) Les animaux sont soumis à une période d'habituation, puis à 30min, ils sont soumis à une alcoolisation aigue par injection d'une dose d'éthanol (2g/KG). L'activité locomotrice est enregistrée pendant 30min. La réponse locomotrice attendue chez les animaux sauvages est une augmentation transitoire de l'activité locomotrice après l'alcoolisation aigue.

(b) Après l'injection d'éthanol les souris sauvages comme KO ont une activité locomotrice qui augmente, puis diminue au cours du temps. Les souris Hsf2 KO sont significativement plus sensibles que les souris WT à l'exposition à l'alcool. Elles ont une hyper-activité locomotrice par rapport aux souris contrôles.

dérégulation de cette transmission est souvent à l'origine du développement et du maintien des phénomènes d'addiction.

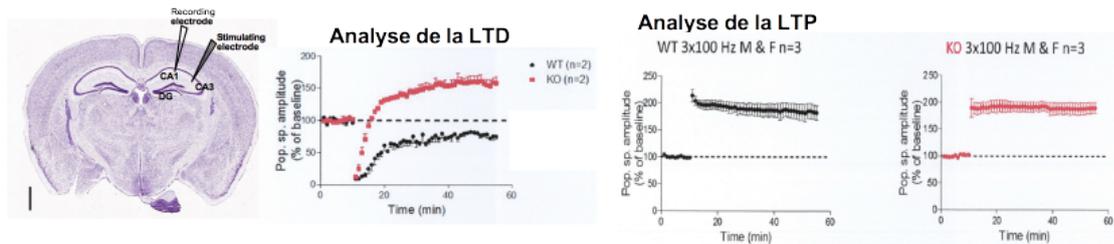
Dans des expériences préliminaires d'études comportementales, des souris *Hsf2* KO ont été testées pour leur réponse à l'addiction aux amphétamines. Cette drogue est connue pour induire une sensibilisation locomotrice des animaux testés, un comportement qui aurait des bases communes avec le comportement addictif (Kalivas et Stewart 1991; Robinson et Becker 1986; Robinson et Berridge 1993). Soumis aux amphétamines, les animaux *Hsf2* KO se sensibilisent moins vite que les souris sauvages. En effet, nous observons qu'elles sont résistantes à la sensibilisation locomotrice, normalement induite par l'absorption d'amphétamines (**Figure 16**).

Ces études comportementales suggèrent que les circuits responsables de l'addiction (circuits de la récompense impliquant les aspects motivationnels relayés par la dopamine, **Figure 3**) sont endommagés, ou non fonctionnels en absence du facteur HSF2.

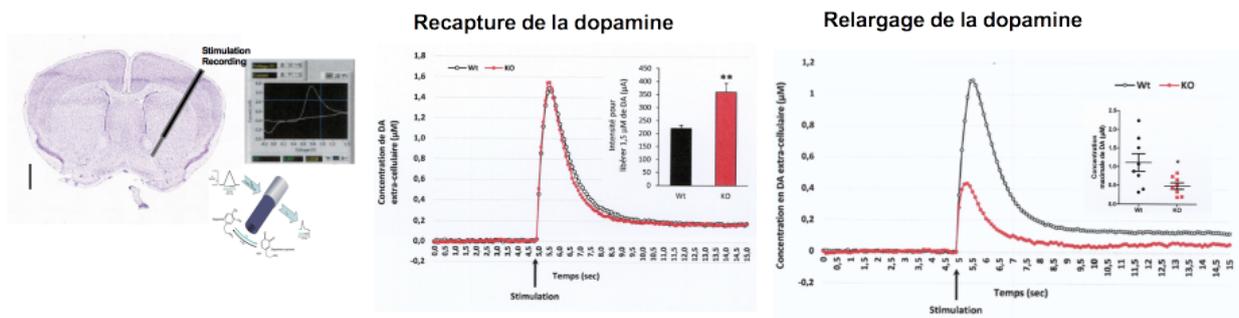
Par ailleurs, dans une étude indépendante en collaboration avec le Pr M. Naassila (CHU d'Amiens), en mimant une alcoolisation aiguë, chez des souris adultes sauvages ou KO pour *Hsf2*, nous avons pu observer une hypersensibilité locomotrice aux effets de l'alcool en fonction du génotype (**Figure 17**). Les souris *Hsf2* KO montre une hyperactivité locomotrice après une injection d'éthanol comparée aux souris sauvages (études menées en collaboration avec M Naassila au CHU d'Amiens)

L'hippocampe, structure impliquée dans le circuit de la récompense (**Figure 3**), intervient dans la sensibilisation (habituación) aux effets de l'alcool, qui se traduit par une augmentation de l'activité locomotrice chez les souris (Robinson et Berridge 1993). Nos collaborateurs ont analysé par électrophysiologie, la potentialisation à long terme (*Long term potentiation*, LTP) et la dépression à long terme (*Long term depression*, LTD) des neurones de la région CA1 de l'hippocampe. Pour cela, ils ont donc soumis les neurones d'une région précise à un courant électrique de haute fréquences, caractéristiques du type de plasticité synaptique recherché, et enregistré le signal électrique qui est la réponse synaptique aux stimuli.

## a- Electrophysiologie dans la région CA1 de l'hippocampe



## b- Voltamétrie dans la région du Coeur de l'accumbens (striatum)



**Figure 18 – Perturbations des mécanismes dépendant de la dopamine dans le circuit mésocorticolimbique**

- a-** Mesure par électrophysiologie de la LTP et la LTD dans la région CA1 de l'hippocampe (réponses synaptiques aux stimuli électriques spécifiques qui déclenchent la LTP ou la LTD). L'expérience montre que la LTD est perturbée chez les animaux Hsf2 KO (**rouge**).
- b-** Mesure par voltamétrie (qui stimule un ensemble de synapses) de la concentration extracellulaire de neurotransmetteurs, on peut en déduire des effets sur la recapture et le relargage synaptique. Le suivi de la concentration de dopamine au niveau de la coquille du noyau accumbens montre que la recapture de la dopamine n'est pas affectée chez les souris Hsf2 KO, mais que le relargage de dopamine est diminué chez ces animaux par rapport aux souris sauvages. (Résultat de collaboration avec M. Naassila, Amiens)

Barres d'échelle=1mm

Cette expérience vise à identifier si le facteur de stress HSF2 est impliqué dans la plasticité synaptique dans l'hippocampe, en étudiant dans un premier temps son implication en conditions physiologiques chez les souris sauvages ou *Hsf2 KO*. L'expérience montre que la LTP n'est pas affectée chez les souris *Hsf2 KO* alors que la LTD est perturbée (**Figure 18 a**).

Par ailleurs Coune et coll. se sont intéressés à la sensibilisation<sup>4</sup> de rats à l'alcool. Ils ont montré que les rats qui se sensibilisent aux effets de l'alcool ont une LTD préservée, alors que ceux qui présentent une résistance à la sensibilisation locomotrice à l'alcool<sup>5</sup> ont une absence de LTD (Coune et al. 2017). Nos résultats sont donc plutôt inattendus, même s'ils associent à nouveau, un défaut de LTD, à un problème de sensibilisation locomotrice.

La quantité de dopamine extracellulaire a aussi été mesurée, en stimulant la coquille du noyau accumbens par voltamétrie, Cette analyse permet également de déterminer si la capture et la libération de dopamine dans cette structure se produisent normalement. Les données obtenues montrent que la concentration extracellulaire de dopamine est diminuée chez les souris *Hsf2 KO*, et cette diminution de dopamine n'est pas due à un problème de recapture mais de relargage de dopamine (**figure 18 b**).

Ces données évoquent des défauts de transmission neuronale et donc peut-être des problèmes au niveau synaptique. Les synapses peuvent être en partie visualisées par les épines dendritiques, qui sont des excroissances membranaires des dendrites au niveau des endroits où s'établit un contact synaptique, et qui forment donc la partie post-synaptique de la synapse.

---

<sup>4</sup> La sensibilisation à un agent signifie qu'après une première exposition à un agent, l'animal a une activité locomotrice plus importante à la seconde exposition par rapport à la première.

<sup>5</sup> Un rat est dit « résistant à la sensibilisation locomotrice à l'alcool » s'il ne présente pas une activité locomotrice plus importante à la seconde exposition à l'alcool par rapport à la première.

#### **IV. Caractérisation morphologiques et cellulaires du cerveau murin adulte en absence du facteur HSF2**

Les données actuelle et les différentes analyses morphologiques et comportementales menées dans l'équipe font apparaitre des altérations structurales du cerveau et des défauts comportementaux chez les souris *Hsf2* KO.

Les défauts comportementaux, électrophysiologiques et voltamétriques, observés chez les souris *Hsf2* KO, soumis à une alcoolisation aiguë, laissent envisager des altérations dans des structures impliquées dans les circuits de la récompense. Pour mieux caractériser ces défauts liés à l'absence de HSF2 chez l'adulte, nous souhaitons donc identifier les structures altérées dans le cerveau de ces souris et quels types de défauts sont présents. Nous souhaitons aussi caractériser de façon statistique l'ampleur de ces altérations, par des mesures de structures du cerveau grâce à des marquages histologiques. Pour aborder des aspects cellulaires, nous avons choisi d'étudier aussi la morphologie des dendrites et la densité des épines.

### **Matériels et Méthodes**

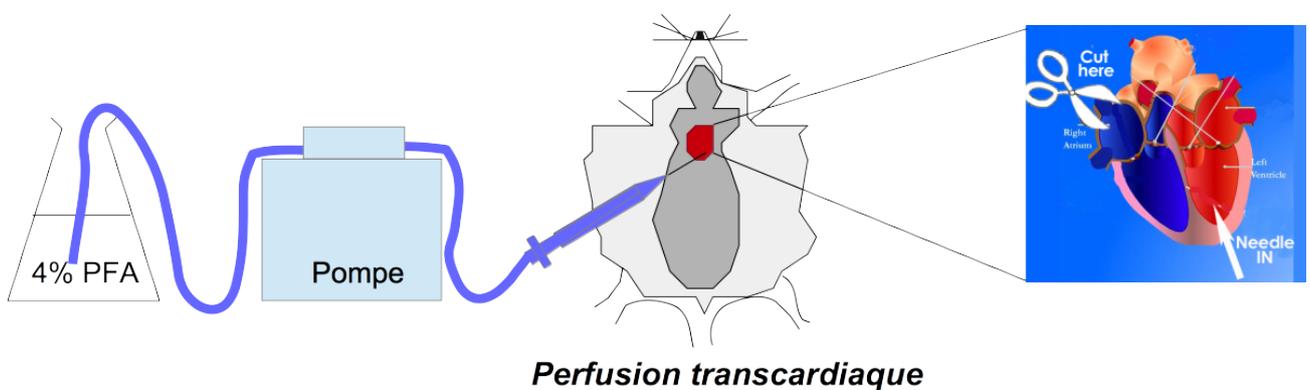
#### **I. Modèle animal adulte**

Les analyses histologiques sont réalisées sur des souris adultes de fond génétique C57Bl/6N qui portent un évènement de recombinaison génétique ayant éliminé une région conséquente du gène *Hsf2* et aboutissant à l'absence d'une protéine HSF2 fonctionnelle (cf documents en Annexe 2). Des souris de 120jours sont utilisées pour le marquage au crésyl violet et de sept semaines à deux mois pour le marquage des dendrites aux cristaux de DiI.

#### **II. Analyse histologique des coupes marquées au Crésyl violet**

##### **1. Perfusion et dissection des cerveaux adultes de souris**

Afin de fixer les tissus murins, les souris sont perfusées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4%. Le système de perfusion est constitué d'une aiguille



**Figure 19 – Méthode de fixation des tissus par perfusion transcardiaque**

*Perfusion transcardiaque d'une solution de PFA à 4%, qui permet de fixer et conserver la morphologie des tissus. Après anesthésie des animaux, le cœur est perfusé par le ventricule gauche, et incisé au niveau de l'oreillette droite afin de faire circuler la solution. La solution circule dans l'ensemble des tissus grâce à une pompe qui la distribue.*

*Après fixation des tissus, des coupes de cerveau sont réalisées, puis marquées par une coloration au crésyl violet.*

montée sur une pompe permettant d'injecter avec un débit de 10ml/min. Les souris sont endormies avec un anesthésique, la kétamine-xylazine (0.1 ml/10g de souris). Après avoir libéré la cage thoracique pour accéder au cœur, celui-ci est perfusé par le ventricule gauche, et incisé au niveau de l'oreillette droite, afin de faire circuler une solution de sodium phosphate à 0.1M, PH7.2, à température ambiante (RT) (50 ml/souris à perfuser) **Figure 19**). Ce premier lavage permet de retirer toutes les cellules sanguines des tissus afin de ne pas les fixer. L'observation du blanchiment du foie, révèle la perte du sang, et permet de vérifier que le circuit de perfusion est correct. La solution saline est ensuite remplacée par une solution de PFA à 4% préparée dans du sodium phosphate à 0.1M, PH7.2 (100ml/souris à perfuser) maintenue à 4°C. L'observation de la rigidité des membres supérieurs et inférieurs, permet de contrôler le bon déroulement de la fixation.

Au terme de la fixation, le cerveau entier est prélevé, puis post-fixé dans du PFA à 4% sur la nuit (Over Night, O/N) à 4°C.

## 2. Coupes flottantes des cerveaux adultes

Deux méthodes de coupe des cerveaux adultes ont été testées en parallèle, pour permettre d'optimiser la récupération des sections de la totalité du cerveau : le vibratome et le cryostat.

### **Coupes au vibratome**

Les cerveaux, fixés sur la nuit sont rincés trois fois au PBS pendant 5min, puis conservés dans du PBS - Azide 0,2 % à 4°C, jusqu'à la coupe pour les préserver de toutes dégradations. Après trois rinçages au PBS, ils sont inclus dans de l'agarose 4%. Lorsque les blocs d'agarose se sont solidifiés, ils sont taillés pour que les cerveaux se présentent par les bulbes olfactifs, tout à fait à plat sur le cervelet, afin de permettre de faire des coupes coronales. Les blocs sont conservés à 4°C dans du PBS jusqu'à la coupe.

Avec cette méthode d'inclusion, les coupes sont ensuite faites au vibratome. Cette méthode permet de faire des coupes à l'aide d'une lame de rasoir qui coupe le cerveau tenu par de la glue sur un porte-objet. Grace aux vibrations, la lame avance sur le tissu.

Les coupes se font en immersion dans une cuve remplie de PBS froid, afin de conserver aux mieux le tissu.

Le vibratome est réglé à une fréquence comprise entre 0 et 1 Hz, et une vitesse comprise entre 0 et 10 mm/s. Les coupes d'une épaisseur de 40µm sont faites selon une orientation coronale. Elles sont récupérées en séries par série de 6 coupes dans du PBS - Azide 0,2 % à 4°C, jusqu'au tri et au marquage.

### **Coupes flottantes au cryostat**

Les cerveaux, fixés sur la nuit sont rincés trois fois au PBS pendant 5min. Ils sont ensuite cryoprotégés dans un bain de sucrose à 30% dans du PBS, en agitation à 4°C sur la nuit. Les cerveaux ainsi cryoprotégés sont inclus pour être congelés. Nous avons essayé différentes méthodes d'inclusion et de congélation pour choisir celle qui préserve au mieux les tissus. Les cerveaux ont été inclus :

- Soit dans du milieu de cryosection commercial, le « Tissue TEK OCT »
- Soit dans un milieu de gélatine/sucrose (respectivement 7,5%/15%), préparé dans un tampon de sodium phosphate 0,12M à pH 7,2.

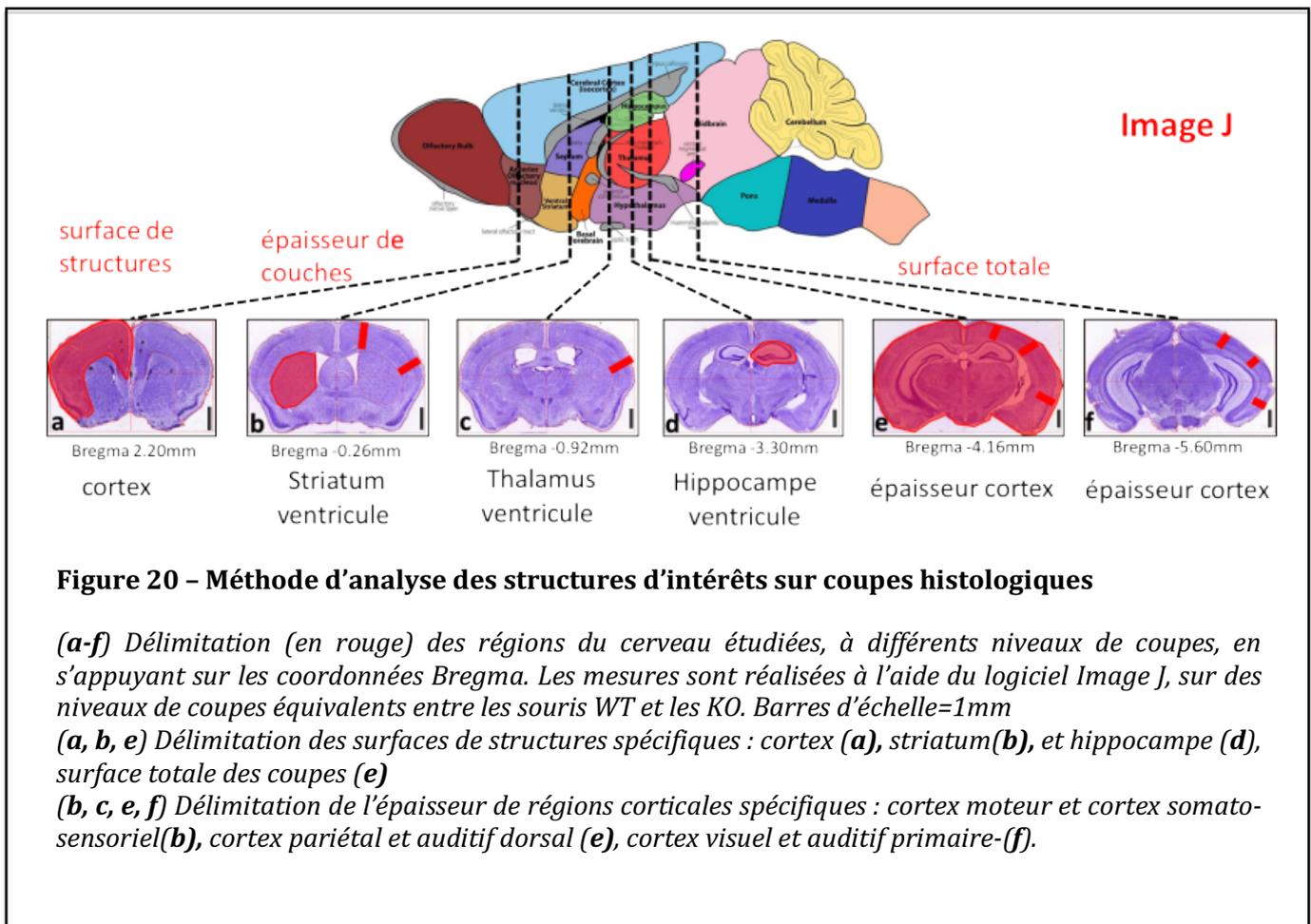
Ils sont ensuite conservés à -80°C, après avoir été congelés, soit :

- Par dépôt des blocs sur de la carboglace (-70°C, congélation lente)
- Dans une solution d'isopentane, maintenue à -90/-120°C dans un bécher placé dans de l'azote liquide (congélation instantanée)

Les coupes à 40µm sont ensuite réalisées au cryostat. Les sections sont récupérées dans un milieu de cryoprotection. Il est composé de : 1/3 d'éthylène glycol, 1/3 de glycérol, et 1/3 de PBS.

### 3. Marquage des coupes au crésyl violet

Le neurone est une cellule spécialisée formée de différents compartiments : un corps cellulaire (ou soma), composé de son noyau et de son cytoplasme riche en corps de Nissl, plusieurs dendrites, et un axone unique. Les corps de Nissl désignent des amas de réticulum endoplasmique rugueux, le RER présent dans les corps cellulaires et les



dendrites des neurones. Le RER correspond à l'association du réticulum endoplasmique et de polysomes, c'est à dire des ribosomes qui synthétisent des protéines. Il est par conséquent riche en ribosomes et en ARNm. La coloration au Crésyl violet marque les ARNs, du fait de leurs propriétés basophiles. Il ne marque pas les axones, ni les synapses qui sont dépourvus de RER.

Les coupes séparées de l'enrobage d'agarose à l'aide d'un pinceau fin sont rincées au PBS, puis montées sur des lames et séchées. La coloration débute par des étapes de déshydratation avec plusieurs bains d'éthanol de concentration croissante. Elles sont ensuite traitées dans un mélange chloroforme:éthanol (1:1), puis réhydratées dans plusieurs bains d'éthanol de concentration décroissante. Le marquage se fait dans une solution de crésyl violet acétate 0,1% pendant 6min environ. Puis le colorant en excès est éliminé dans des bains d'eau et une étape de différenciation dans de l'éthanol acide est réalisée. Les sections sont ensuite à nouveau déshydratées en éthanol et transférées en xylène. Les lames sont finalement montées avec un milieu de montage non aqueux (Eukit).

#### 4. Analyse des structures des cerveaux WT et KO

Le marquage au crésyl violet permet d'observer l'arrangement des cellules au sein des tissus neuronaux afin de mettre en évidence des défauts d'organisation morphologique, et des défauts de proportions des différentes structures du tissu.

L'intérêt de l'analyse des tissus marqués au crésyl violet est de mesurer des structures du cerveau d'intérêt pour identifier et quantifier les différences entre les animaux sauvages et les mutant HSF2. Après observation en microscopie optique à fond clair, les images des colorations sur les coupes/régions d'intérêt sont réalisées. Les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel Image J, et en s'appuyant sur différents Atlas (Paxinos et AllenBrain). Chaque structure d'intérêt (distance ou surface) est mesurée à un niveau de coupe équivalent chez la souris WT et la souris KO ; La stratégie d'analyse mise en place est d'identifier six niveaux de coupes sur l'axe antéro-postérieur (ou rostro-caudal) permettant de parcourir l'ensemble des structures d'intérêts (**Figure 20**) :

- Le niveau 1 (bregma 2.20mm) permet de mesurer l'épaisseur du cortex préfrontal : la longueur du cortex cingulaire et du cortex prélimbique

- Le niveau 2 (bregma -0,26mm) permet de mesurer l'épaisseur du cortex moteur primaire et celle du cortex somatosensoriel, la surface des ventricules, du striatum, les épaisseurs du corps calleux et de la commissure antérieure
- Le niveau 3 (bregma -0.92mm) permet de mesurer : l'épaisseur du cortex moteur primaire et celle du cortex somatosensoriel, la surface du thalamus, l'épaisseur du corps calleux
- Le niveau 4 (bregma -3.30) permet de mesurer les surfaces des ventricules et des hippocampes
- Le niveau 5 (bregma -4.16mm) permet de mesurer l'épaisseur des cortex pariétal, ventral auditif et entorhinal
- Le niveau 6 (bregma -5.60mm) permet de mesurer l'épaisseur des cortex visuel, ventral auditif et entorhinal

Pour chaque coupe les deux hémisphères sont mesurés. Les longueurs et épaisseurs mesurées sont normalisées en rapportant chaque mesure à la surface totale de la coupe. Les mesures des surfaces de structures sont aussi rapportées aux surfaces globales de chaque coupe.

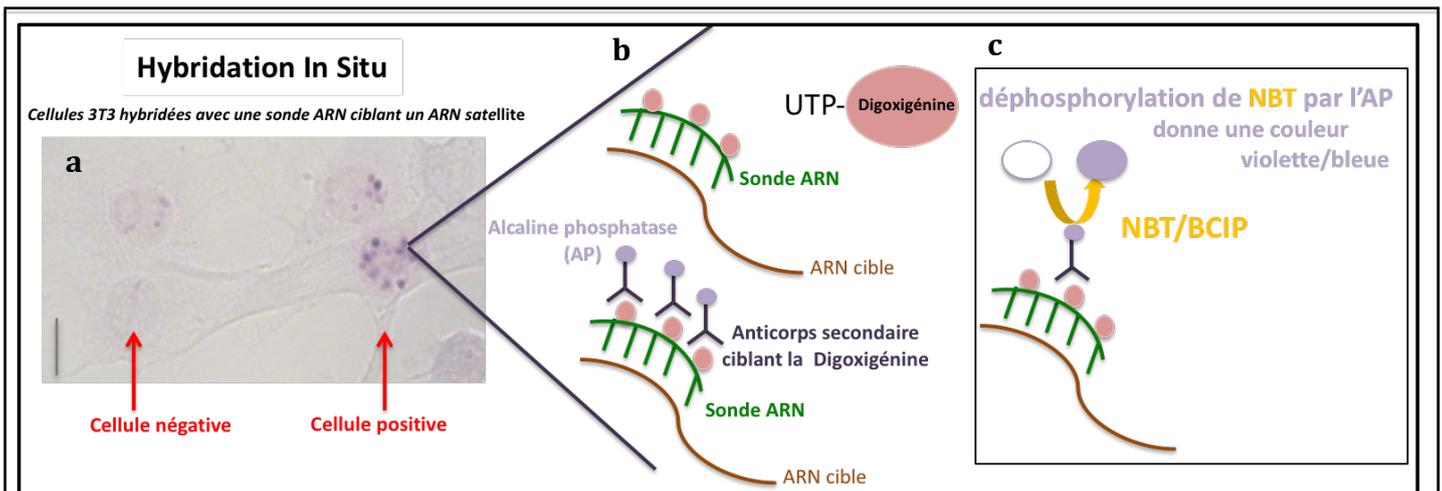
### III. Analyse de marqueurs de couches spécifiques

#### 1. Préparation des tissus et des coupes de cerveaux adultes

La préparation des tissus (perfusion et dissection) est identique à la préparation faite pour le marquage au crésyl violet (voir Chapitre II, section II.1).

Nous avons réalisé soit :

- Des coupes flottantes, comme décrit (voir Chapitre II, section II.2),
- Des coupes sur lames. Les coupes sont réalisées à 12µm dans la chambre froide du cryostat, et directement déposées sur la lame. Les lames sont des Superfrost Ultra Plus. Elles ont une charge positive qui permet la fixation des coupes par attraction électrostatique. La différence de température entre la lame et le tissu permet aussi l'adhésion des coupes sur la lame.



**Figure 21 – Représentation schématique du principe d’HIS**

**(a) Panneau de gauche-** HIS réalisée sur des cellules 3T3 hybridées avec une sonde ARN antisens et ciblant un ARN satellite. L’expérience montre le marquage attendu : on observe une cellule non marquée (négative), et une cellule marquée (positive) . Barre d’échelle : 50µm

**(b) Panneau du milieu-** Schéma représentant une sonde couplée à la digoxigénine, et qui fixe la séquence ARN d’intérêt par complémentarité. L’anticorps secondaire couplé à l’alcaline phosphatase (AP) cible la digoxigénine.

**(c) Panneau de droite-** La sonde est révélée par une réaction enzymatique de l’alcaline phosphatase qui déphosphoryle le NBT et produit une coloration bleue/violette.

## 2. Hybridation *in-situ* sur lames

### **Principe**

L'Hybridation *in-situ* (HIS), permet de révéler la présence d'un ARNm dans la cellule ou le tissu. Le marquage du tissu est réalisé grâce à une sonde, ARN complémentaire de la séquence d'intérêt, qui s'hybride donc, par complémentarité de séquence, sur les ARNm exprimés à partir du gène d'intérêt. L'HIS permet de révéler la localisation cellulaire et, l'intensité relative de l'expression de ces gènes. Les sondes sont identifiées par la présence de digoxygénine portée par un UTP. La digoxygénine peut être révélée par immunomarquage grâce à un anticorps couplé avec un marqueur de fluorescence, ou une enzyme qui catalyse une réaction colorée (**Figure 21**).

### **Préparation et marquage des sondes (exemple de la sonde Reelin)**

Le fragment d'ADN complémentaire pour le gène d'intérêt est cloné dans un plasmide qui servira d'amorce pour la synthèse de l'ARN sonde complémentaire de ce gène. Ainsi, la première étape consiste à amplifier le plasmide pBS-RL6 contenant l'ADN complémentaire de l'ARNm de Reelin puis à le linéariser pour lui permettre de servir d'amorce pour la préparation de la sonde. Pour cela, j'ai utilisé des bactéries d'*Escherichia Coli* (E.Coli) DH5 $\alpha$ . J'ai procédé à plusieurs étapes :

- Les bactéries DH5 $\alpha$  ont été rendues compétentes pour la transformation par électroporation,
- Les bactéries ont été transformées avec le plasmide pBS-RL6 contenant l'ADNc codant la sonde Reelin, puis sélectionnées sur un milieu de culture semi-solide contenant de l'ampicilline, puis amplifiées en milieu liquide,
- Le plasmide pBS-RL6 a été extrait des bactéries DH5 $\alpha$  avec un kit de Maxiprep (Macherey-Nagel),
- Le plasmide extrait a été linéarisé par l'action de l'enzyme de restriction XhoI.

A partir du plasmide linéarisé, j'ai réalisé une transcription *In Vitro* du brin complémentaire de l'ADNc de la *Reelin* (1475pb) par l'action de l'ARN polymérase T3 (Promega). La sonde ainsi transcrite en ARN est ensuite purifiée (kit de purification Microspin G50), et contrôlée par migration sur gel d'agarose 1,5% TAE 1X, avant et après purification. Cette transcription *in vitro* permet aussi de coupler la sonde avec la Digoxigénine, qui s'insère grâce à des uraciles couplés avec la digoxygénine pendant la transcription.

L'immuno-marquage, permettant la révélation du signal, se fait grâce à l'anticorps anti-digoxigénine, qui est couplé à une alcaline phosphatase. En incubant les coupes avec un substrat de l'alcaline phosphatase, le NBT/BCIP, une réaction d'oxydo-réduction (déphosphorylation), révèle une coloration visible bleue/violette (voir protocole complet d'HIS sur lame en **Annexe 3**).

Nous avons choisi de préparer des sondes ARNs (et non ADN) qui présentent l'avantage de former des dimères ARN-ARN très stables à haute température et résistant aux ribonucléases.

### **Étapes du protocole HIS sur lames**

C'est un protocole qui se fait sur plusieurs jours, permettant des incubations sur la nuit.

Premier jour : perméabilisation, post-fixation et hybridation avec la sonde des coupes (voir protocole complet en **Annexe 3**)

- Séchage des coupes à l'air libre, puis bref rinçage au PBS
- Perméabilisation des membranes cellulaires, pour perforer la membrane plasmique. J'ai essayé deux méthodes de perméabilisation. :
  - **La protéinase K (PK)** : cette enzyme dégrade les protéines membranaires. PK, à 10µg/ml de PK dans PBS Tween-20 (PBT) à 0,1%. Incubation des coupes 3min sous agitation.
  - **La solution RIPA** : cette solution est un mélange de détergents qui dégradent les lipides membranaires. L'utilisation de cette solution permet de préserver les protéines, ce qui nous laisse la possibilité de faire des co-marquages combinant hybridation *in situ* et immuno- marquages sur les mêmes lames.

Cette solution contient les détergents NP40 (1%), SDS (1%), Na Déoxycholate (0,5%) ainsi qu'un tampon Tris (50mM pH8), des sels (150mM NaCl) et de l'EDTA (1mM)

- Post-fixation dans du PFA 4%, pendant 15min, puis rinçages au PBS

- Traitement des coupes au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%). Ce traitement diminue le bruit induit par la peroxydase endogène qui produit une coloration aspécifique des cellules.
- Traitement au triéthanolamine -acetic anhydre (0,25%), pour diminuer le bruit de fond
- Rinçages au PBT (PBS +0,05% Tween20),
- Préhybridation dans un tampon contenant des ARN de levure et de sperme de saumon pour bloquer les sites de fixation non spécifiques
- Hybridation, avec les sondes couplées à la Digoxigénine au bain marie à 70°C sur la nuit sous agitation.

#### Deuxième jour : lavages et incubation avec l'anticorps

- Lavages successifs dans une solution saline, au bain marie à 70°C sous agitation.
- Incubation pendant 1h dans une solution de blocage (contenant du serum de veau foetal)
- Incubation sur la nuit à 4°C avec l'anticorps anti-digoxigénine

#### Troisième jour : lavages et révélation

- Lavages à RT dans une solution de lavage MABT
- Incubation dans du NTMT pH9,5 préparé extemporanément.
- Révélation au NBT/ BCIP.

Le signal, correspondant à une coloration bleue/violette. Il est vérifié toutes les heures.

- Blocage de la réaction par incubation dans du NTMT
- Rinçages au PBS.
- Séchage des coupes
- Inclusion entre lame et lamelle, dans un milieu de montage à base de glycérol, le *mowiol*

### 3. Hybridation *in-situ* en coupes flottantes

Les étapes de préparation des sondes et le principe de marquage est similaire à ce qui a été décrit précédemment. Néanmoins, pour les coupes flottantes il y a une étape de déshydratation et réhydratation avant la perméabilisation des coupes par la PK ou RIPA (voir protocole complet en **Annexe 4**) :

#### Déshydratation et réhydratation :

Déshydratation par des bains de concentration croissante en Ethanol (de 25% à 100%) puis ré-hydratation par des bains de concentration décroissante en Ethanol (de 100% à 25%).

Les coupes subissent alors des rinçages successifs au PBT.

Les étapes de lavage, d'hybridation et d'immunomarquage se font en solution sur des coupes flottantes. Après le marquage, les coupes sont montées sur lame, séchées et incluses entre lame et lamelle, dans un milieu de montage à base de glycérol, le *mowiol*.

#### 4. Méthode d'analyse de marqueurs spécifiques de couches

Les marquages sont analysés à des niveaux de coupes équivalents. En ciblant des régions d'intérêt comme le cortex préfrontal, l'hippocampe, ou le striatum. Après avoir fait des acquisitions d'images en microscopie photonique à champ clair (objectif x10, x20 ou x40), j'ai analysé les images avec le logiciel Image J. J'ai en particulier, compté les cellules marquées dans des régions délimitées.

Pour la région du cortex préfrontal et pour l'hippocampe, j'ai compté les cellules de l'ensemble de la structure.

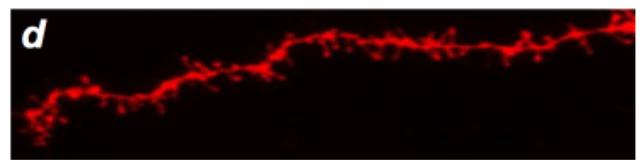
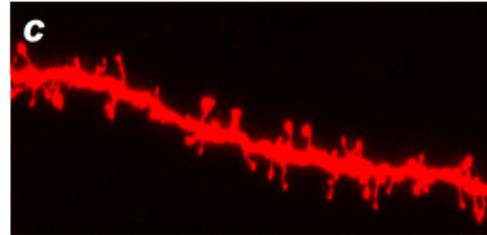
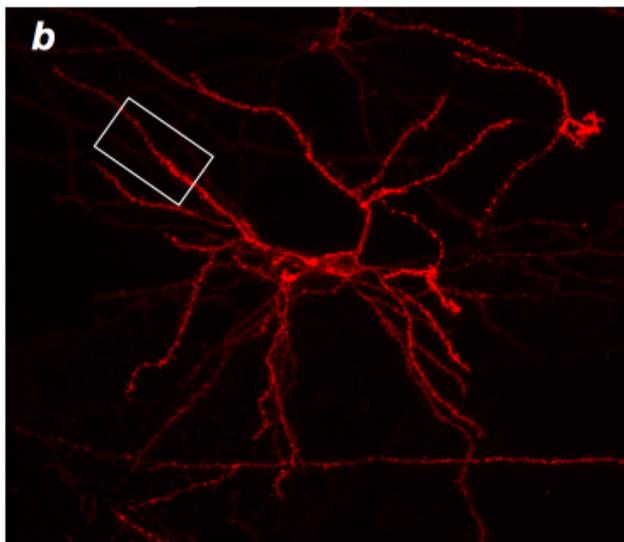
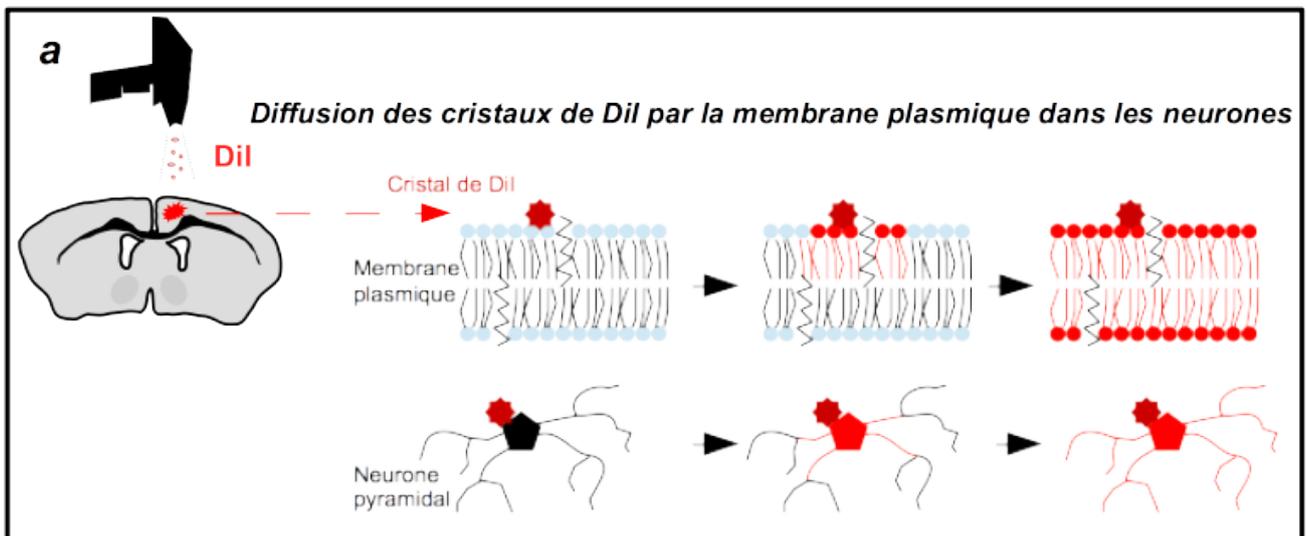
Pour des structures plus volumineuses, comme le striatum, j'ai choisi une zone qui me paraissait représentative du marquage de la structure. J'ai compté les cellules sur cette zone dans laquelle j'ai délimité une surface, afin de pouvoir l'appliquer sur toutes les autres coupes et sur la même zone.

### **IV. Analyse morphologique et quantitative des épines dendritiques**

#### 1. Méthode de la DiOlistique pour le marquage des neurones au DiI

La biolistique (issu du terme balistique), est une méthode permettant d'injecter un fragment d'ADN d'intérêt directement dans la cellule. Cette technique habituellement utilisée pour les cellules végétales utilise un canon à ADN, ou « *gene gun* », afin de propulser le fragment d'intérêt dans les cellules. L'ADN est enrobé sur des microbilles de métal (or ou tungstène) d'un micromètre de diamètre. C'est la très grande vitesse de propulsion des billes, qui leur permet de traverser les membranes cellulaires. L'ADN intègre alors de façon spontanée et aléatoire le génome dans certaines cellules.

Cette technique peut être détournée pour insérer, non pas des séquences codantes d'ADN, mais des colorants fluorescents afin de marquer les cellules. On ne parle plus alors de Biolistique, mais plus précisément de DiOlistique (Staffend et Meisel 2011; Sherazee et Alvarez 2013). Dans le cadre d'une collaboration avec notre équipe, je me suis formée à cette technique de marquage avec le soutien de Jorge Diaz, au Centre de Psychiatrie et



**Figure 22 – Méthode de marquage des neurones aux cristaux de Dil par la technique de la Diolistique**

*(a) Schéma expérimental du marquage des neurones aux cristaux de Dil par la technique de la Diolistique : les cristaux de Dil sont propulsés sur les coupes à l'aide du « gene gun ». Les cristaux marquent toute la cellule en diffusant dans la membrane plasmique.*

*(b) Image réalisée en microscopie confocale montrant le marquage attendu : neurone entier marqué du corps cellulaire aux dendrites.*

*(c) Agrandissement d'une partie de la dendrite d'intérêt montrant les épines à quantifier.*

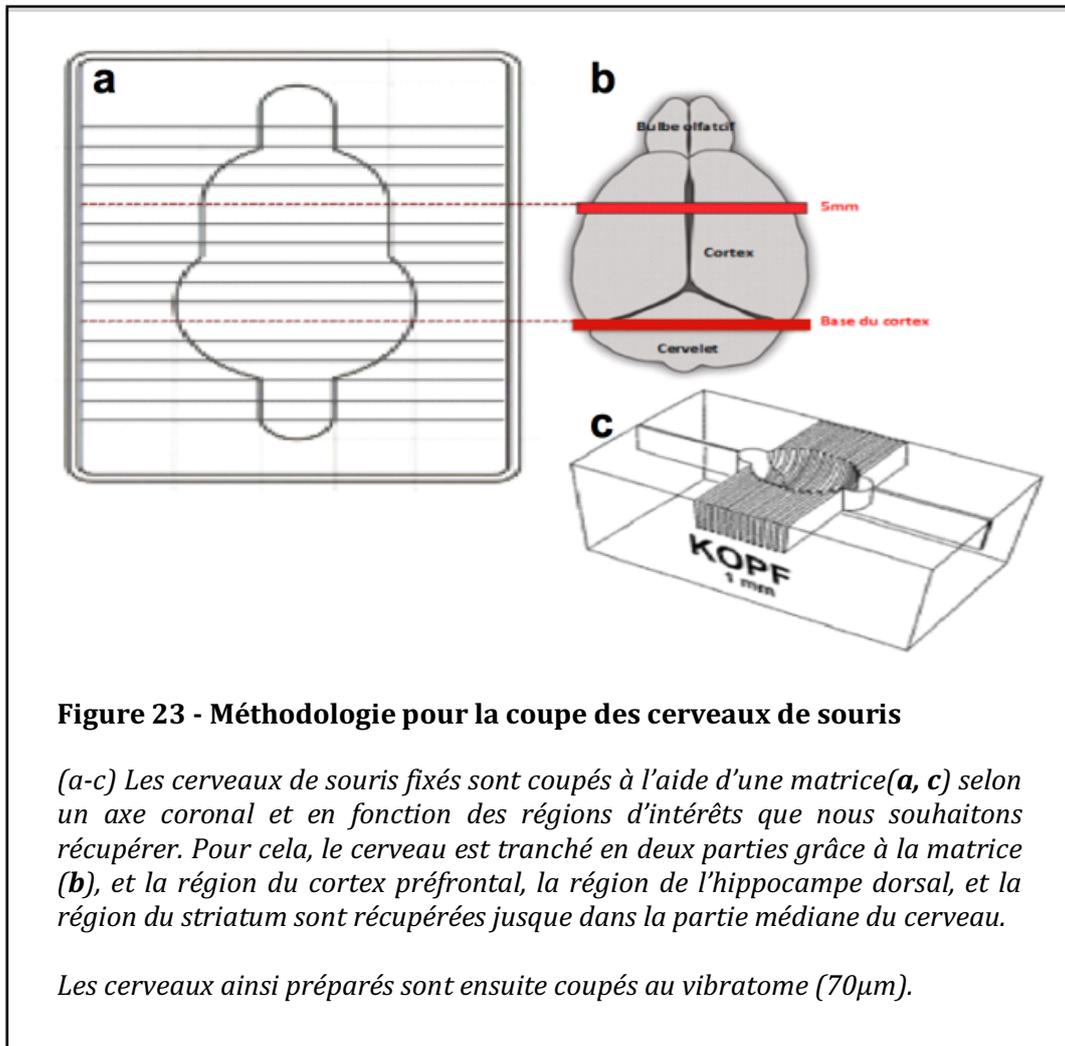
*(d-e) Image réalisée en microscopie confocale (d), et image produite par le logiciel NeuroLucida (e), montrant la méthode d'analyse semi-automatique des épines grâce au logiciel NeuroLucida. Le logiciel permet de tracer la dendrite, puis de pointer l'extrémité des épines (e). Le logiciel effectue plusieurs mesures notamment : la longueur de la dendrite, la densité des épines, et leurs longueurs.*

Neurosciences (CPN, U894), à l'hôpital Saint-Anne. Afin d'analyser les neurones des souris mutantes pour le gène *Hsf2*, j'ai utilisé la technique de DiOlistique pour projeter dans les tissus des microcristaux de DiI. Ce colorant fluorescent est liposoluble. Il permet de marquer les neurones en diffusant de façon latérale sur la membrane plasmique lipophile pour colorer l'intégralité de la membrane plasmique du neurone. Des billes de tungstène enrobées de cristaux de DiI sont propulsées par un pistolet à air comprimé et vont atteindre de façon aléatoire la membrane de certaines cellules. Cela permet de ne marquer que quelques neurones seulement, ce qui permet de suivre l'ensemble de leurs prolongements (axone et dendrites) de façon isolée. **(Figure 22)**. Les cristaux émettent à une longueur d'onde de 565nm et sont donc visibles en microscopie à épifluorescence (Gallais et Ricroch 2006).

## 2. Préparation des billes de tungstène couplées au colorant DiI

Les billes de tungstène sont mises en solution à raison de 6g de billes dans 2ml de chlorure de méthylène. Après centrifugation de 100µl/tube de billes en solution, des aliquots de 300mg de billes sont réservés à température ambiante. La solution de DiI est préparée à une concentration finale de 30mg/ml dans du méthylène chloride (13.5mg de Dye DiI lipophile dans 450µl de chlorure de méthylène). La solution de billes et la solution de DiI (100µl chacune) sont mélangées et déposées sur une lame. Après avoir laissé sécher le mélange sur la lame, il cristallise. Les billes recouvertes de microcristaux sont grattées et récupérées sur un papier fin qui servira d'entonnoir pour les resuspendre dans un tube Falcon avec 3ml d'eau. La suspension est soniquée 10 à 30min à température ambiante (Room temperature, RT), pour éviter la formation d'agrégats de billes et favoriser le marquage unique des neurones.

La solution ainsi prête est insérée, à l'aide d'une seringue, dans des tubes qui serviront de cartouche pour charger le canon du pistolet. Les tubes sont rincés au préalable avec une solution de PVP (polyvinylpyrrolidone) 10mgPVP/ml, pour améliorer l'adhésion des billes sur les parois du tube. Après introduction des billes dans les tubes, ceux-ci sont séchées à l'azote jusqu'à ce que les billes soient collées aux parois des cartouches (Seabold et al. 2010).



### 3. Perfusion et dissection des cerveaux adultes de souris

Les étapes de perfusion pour la fixation des tissus sont identiques aux étapes décrites précédemment. Contrairement aux tissus préparés pour le marquage au Cresyl violet et l'HIS, ici la première étape de lavage se fait avec une solution saline de NaCl 0.9% maintenue à 37°C (50 ml/souris à perfuser), à la place de la solution tampon de sodium phosphate 0.1M pH7.2. Les tissus sont fixés avec du PFA 2% en sodium phosphate 0.1M pH7.2. Les tissus sont post-fixés dans une solution de PFA 2% pendant 2h à 4°C, suivi de trois rinçages au PBS. Les cerveaux sont conservés dans du PBS - Azide 0,2 % à 4°C jusqu'à la coupe pour les préserver de toutes dégradations.

### 4. Coupes au vibratome

Les coupes de 70µm d'épaisseur sont réalisées avec un vibratome *Leica* et récupérées dans du PBS froid. Pour organiser les coupes, les cerveaux sont coupés en deux parties : une antérieure et une postérieure. A l'aide d'une matrice qui permet de faire des tranches reproductibles de 1mm, le cerveau est coupé à la base du cervelet (au-dessus du cortex), puis 5 mm en partant du bulbe olfactif (**Figure 23**). Cette coupe à hauteur de 5 mm sera la base permettant de coller le cerveau sur le plateau du vibratome. Pour la partie antérieure (des bulbes olfactifs jusqu'à 5 mm), les coupes sont récupérées en série dans la totalité du bloc, afin d'obtenir les régions du cortex préfrontal, du striatum et du noyau accumbens. Pour la partie postérieure, depuis les 5mm jusqu'à la base du cervelet, seules les coupes contenant la région dorsale de l'hippocampe sont récupérées toujours en coupe sériées. Les coupes plus ventrales ne font pas partie de l'étude. Pour chaque région d'intérêt nous avons choisis trois coupes du même niveau qui seront marquées ensuite par DiOlistique avec le Dil.

### 5. Marquage des coupes au Dil

Pour chaque région d'intérêt du cerveau trois coupes de même niveau sont sélectionnées. Les coupes sont déposées à plat au fond d'un puits d'une plaque de 12 puits. Afin de marquer les coupes, le PBS est aspiré en totalité. Les coupes peuvent être marquées de deux façons différentes :

- soit par dépôts des cristaux de colorant à l'aide de deux capillaires en verre très fins, qui sont frottés l'un contre l'autre afin de laisser tomber les cristaux sur les cellules. Les cristaux de DiI sont, au préalable, préparés comme décrit précédemment. Les plus petits cristaux sont sélectionnés à l'aide d'une double filtration (filtres nylon de 80µm superposés), puis déposés sur les coupes à l'aide des capillaires.
- soit par la technique de DiOlistique.

Les deux techniques ont été utilisées dans cette étude pour des raisons de disponibilité de matériel. La DiOlistique offre un marquage plus fin et homogène et constitue la méthode utilisée en majorité dans cette analyse.

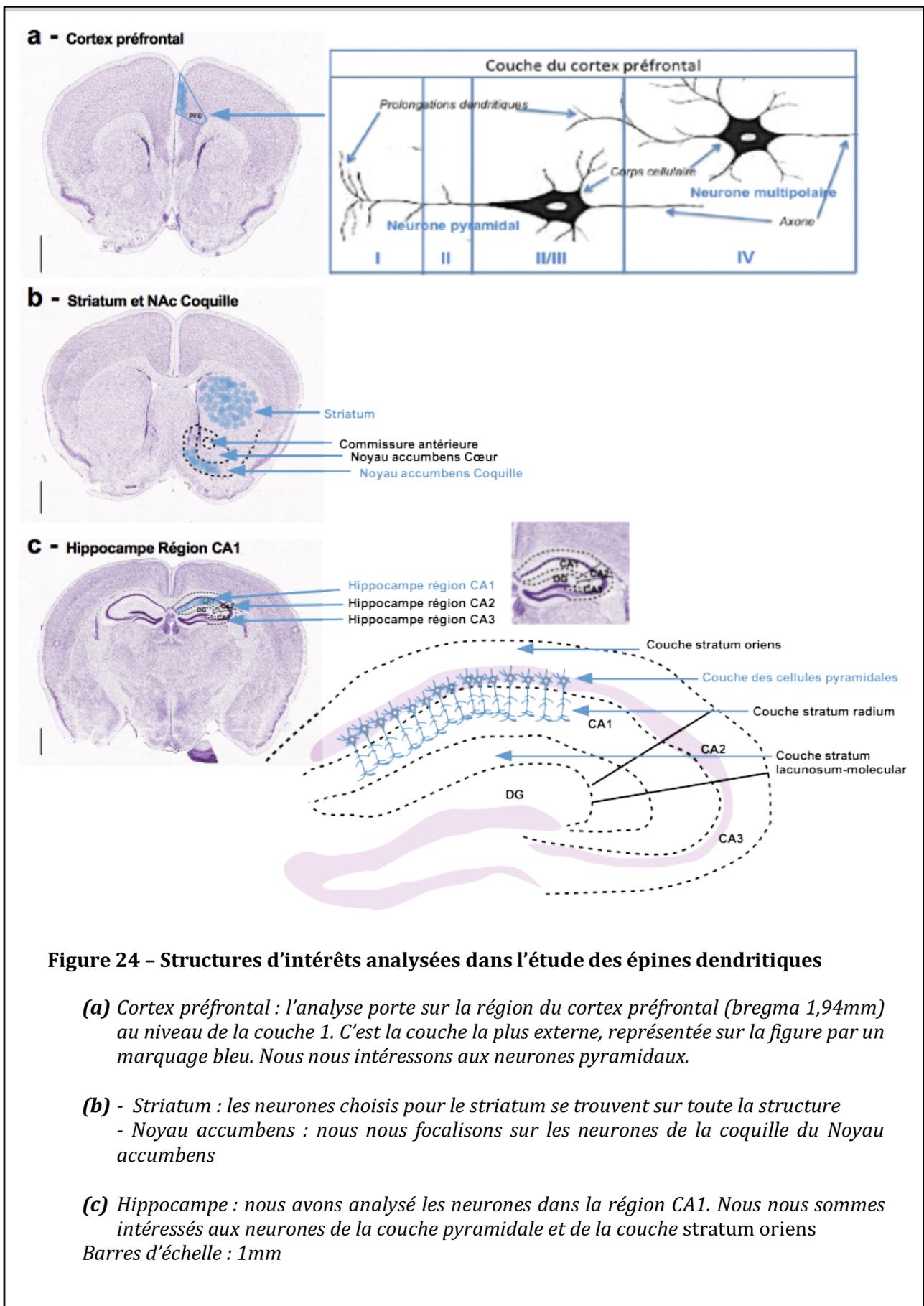
Après le dépôt des cristaux de DiI, les coupes sont recouvertes de PBS pour laisser le DiI diffuser pendant 3h30. Elles sont ensuite fixées 30min avec du PFA à 4% dans du tampon PBS et rincées trois fois avec du PBS. La diffusion des cristaux de DiI dans les dendrites continue sur la nuit. Les coupes sont étalées sur lames, brièvement séchées et montées dans un milieu de montage à base de glycérol, le *mowiol*, pour empêcher la déshydratation des coupes qui entrainerait la déformation des dendrites et pour permettre la visualisation du DiI en microscopie confocale à fluorescence.

## 6. Microscopie confocale

J'ai réalisé l'acquisition des images de neurones marqués aux cristaux de DiI, à la plateforme d'imagerie cellulaire NeurImag, (collaboration avec Jorge Diaz, et David Geny, au Centre de Psychiatrie et Neurosciences, hôpital Sainte-Anne)

L'acquisition d'images est faite au microscope confocal à fluorescence *Leica* (modèle *Leica SP5 STED CW*), selon les paramètres suivants :

- Domaines spectraux des cristaux de DiI : absorption de la lumière à une longueur d'onde maximale de 549nm et émission à une longueur d'onde de 565nm. La source d'excitation laser choisie est donc un laser diode à 561nm (DPSS 561 nm/10mW). Il est réglé entre 10% et 15%
- Les images sont scannées avec un format de 400Hz / 1024X1024 pixels
- Le grossissement utilisé est l'objectif X40 (objectif à huile HCX PL Apo / ON 1.25-0.75), avec un Zoom X3



- La distance entre les plans d'images (Z) = **0,29**
- Lin average = 2
- Fram average = 1
- Smart Gain = entre 700 et 900

## 7. Quantification des épines dendritiques

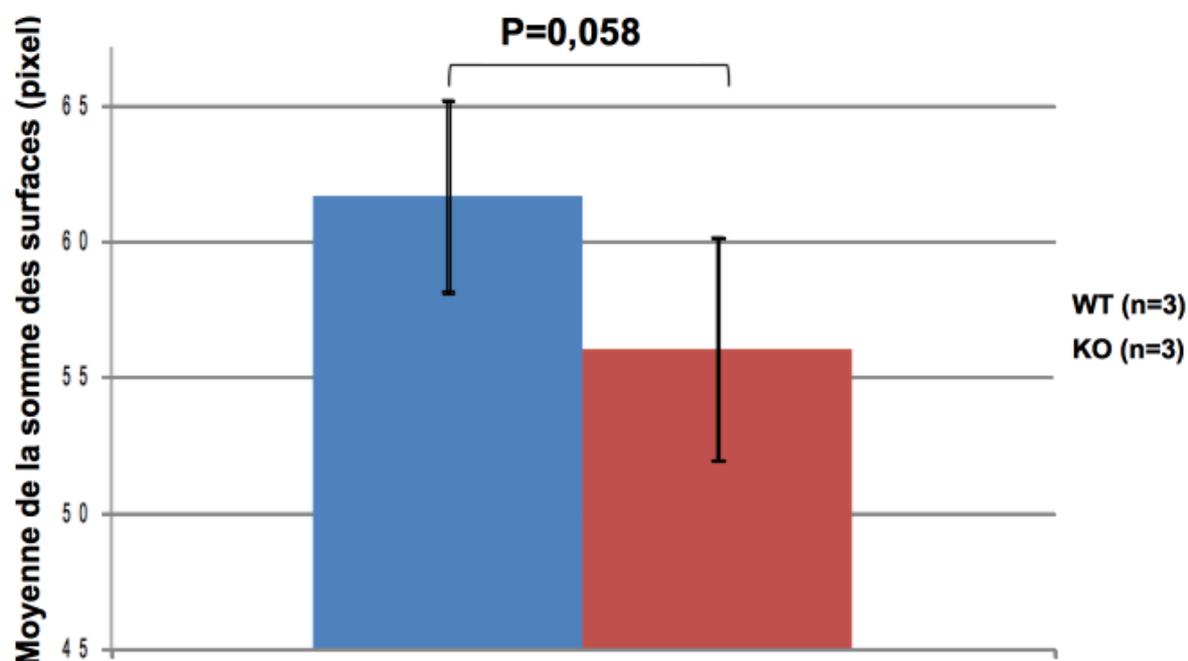
L'analyse des épines dendritiques des coupes marquées au DiI a été réalisée avec le logiciel *Neurolucida* à partir des acquisitions au microscope confocal (*Leica*). Ce logiciel permet une analyse semi-automatisée des épines. Pour chaque animal quatre régions sont analysées : le cortex préfrontal, le striatum, le noyau accumbens et l'hippocampe. Chacune de ses régions compte dix acquisitions de dendrites de différents neurones (n=10 pour chaque région). Le critère de sélection des dendrites à quantifier, combine à la fois les dendrites les plus isolés, et les plus visibles sur toute leur longueur. L'acquisition de l'image se fait par fixation d'une extrémité de la dendrite et balayage de celle-ci jusqu'à l'autre extrémité.

Au niveau du cortex, ce sont les prolongements dendritiques visibles dans la couche 1 du cortex préfrontal qui sont quantifiés. La couche 1 est dépourvue de neurones. Le marquage observable dans cette couche révèle les neurones marqués dans la couche 3 du cortex et dont les prolongements dendritiques se situent dans la couche 1 (visibles après diffusion du DiI) (**Figure 24**).

Au niveau du striatum et du noyau accumbens, pour garder un même niveau d'analyse des coupes, les acquisitions ont été faites sur les coupes les plus antérieures, où le corps calleux des deux hémisphères se croisent. L'analyse se fait sur l'ensemble du striatum sans différencier de sous-partie. La zone ciblée du noyau accumbens est la partie de la coquille (NAc shell). Pour rester sur une même zone d'analyse pour chaque coupe afin que l'analyse puisse être représentative, les cellules choisies pour l'analyse de la coquille du NAc (NAc shell) se trouvent toujours en dessous de la commissure antérieure (**Figure 24**).

Les neurones quantifiés de l'hippocampe sont localisés sur les hippocampes en position dorsale. Les analyses portent plus spécifiquement sur les neurones de la région CA1 de l'hippocampe, dans la couche pyramidale, et la couche stratum oriens (**Figure 24**).

## Moyenne de la somme des surfaces des coupes de souris mâles adultes



**Figure 25 – Tendence vers une diminution de la somme des surfaces de l'ensemble des coupes, en absence de HSF2.**

*Moyenne de la somme des surfaces de l'ensemble des coupes coronales de cerveau de souris adultes mâles C57B/6N de 120 jours (40µm, colorées au crésyl violet). Analyse des souris sauvages (en bleu, n=3), et des souris Hsf2 KO (en rouge, n=3). Statistiques : t-test (p=0,058), barre d'erreur : écart moyen.*

## Résultats

### I. Altérations morphologiques induites par l'absence du facteur HSF2 dans le cerveau adulte

#### 1. Altération de la surface des coupes en absence du facteur HSF2

##### 1.1 Réduction de la surface de la région antérieure du cerveau en absence du facteur HSF2.

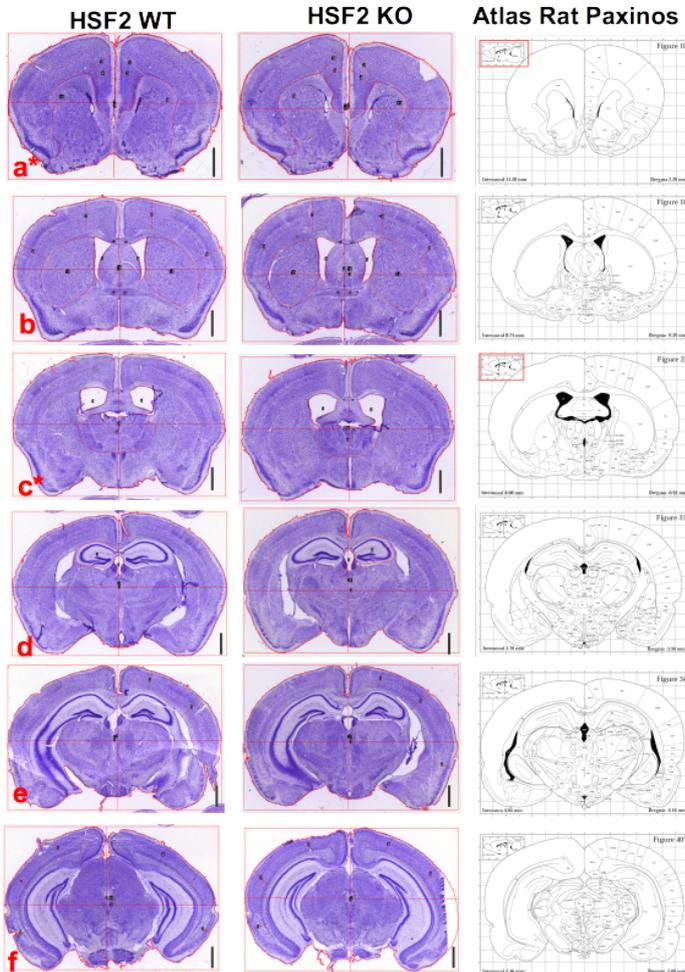
Il a déjà été observé que la structure du cortex est altérée en absence de HSF2 (Kallio et al. 2002a). Malgré l'aspect extérieur clairement identifiable avec un cerveau légèrement aplati, aucune quantification précise de ce défaut n'avait été réalisée.

Afin de caractériser les altérations des différentes structures du cerveau, j'ai réalisé puis analysé, des coupes de cerveaux de souris mâles adultes (120 jours) après coloration au crésyl violet, sur un échantillon de 3 animaux sauvages et 3 animaux KO pour *Hsf2*. Plusieurs types d'analyses ont été réalisées : des mesures de surface totale de coupes du cerveau, des mesures de surfaces de coupe de structures identifiables, et des mesures d'épaisseurs de la couche corticale à différents niveaux du cortex.

Nous avons voulu vérifier tout d'abord, si le volume du cerveau était impacté par la déformation déjà décrite dans l'article de Kallio et coll. Pour cela, j'ai mesuré la surface de coupes entières à différents niveaux du cerveau. La somme de surface des coupes à différents niveaux est indicative du volume du cerveau. Nous observons que le volume du cerveau tend fortement vers une diminution chez les souris *Hsf2* KO ( $p=0,058$ ), par rapport au souris sauvages (**Figure 25**). Ceci suggère déjà, qu'il pourrait y avoir une réduction de la surface d'une, ou plusieurs structures du cerveau, ou un réarrangement global des structures du cerveau.

Pour déterminer si cette tendance est globale, ou régionalisée, j'ai comparé la surface des sections à chaque niveau de coupes du cerveau des souris sauvages, et *Hsf2* KO. Ce comparatif révèle que les surfaces à deux niveaux de coupes sur la partie antérieure du cerveau sont significativement réduites (à bregma 2,20mm, et à bregma -0,92mm, voir

**A- Coloration au Crésyl violet**



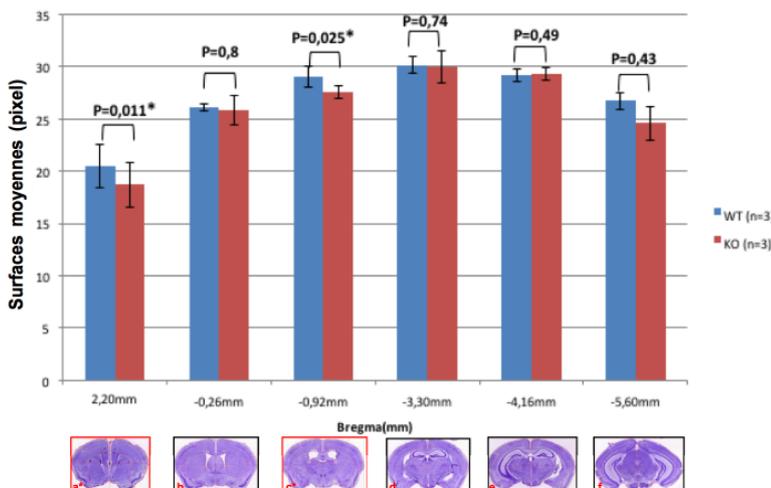
**Figure 26 – L'absence du facteur HSF2 induit la diminution des surfaces moyennes des coupes en partie antérieure du cerveau.**

(A) Image de microscopie optique, montrant des coupes coronales (40µm, observation X10, barres d'échelle :1mm) colorés au Crésyl violet, chez le Hsf2 WT et le KO (A-a à A-f), et permettant la mesure de la surface totale des coupes, et les références atlas paxinos correspondante (panneau de droite)

(B) Quantification des surfaces totales moyennes des coupes chez les WT (bleu) et KO (rouge) aux différents niveaux bregma d'intérêt. Statistiques :t-test, barres d'erreur : écart moyen.

(C) Les différents niveaux de coupes analysés (bregma 2,20mm (C-a), -0,26mm (C-b), -0,92mm (C-c), -3,30mm (C-d), -4,16mm (C-e), -5,60mm (C-f) chez le HSF2 WT et le KO.

**B- Surfaces moyennes des coupes de cerveau adulte mâle**



On note une diminution spécifique des surfaces moyennes chez les souris KO en partie antérieure, à bregma 2,20mm et -0,92mm.

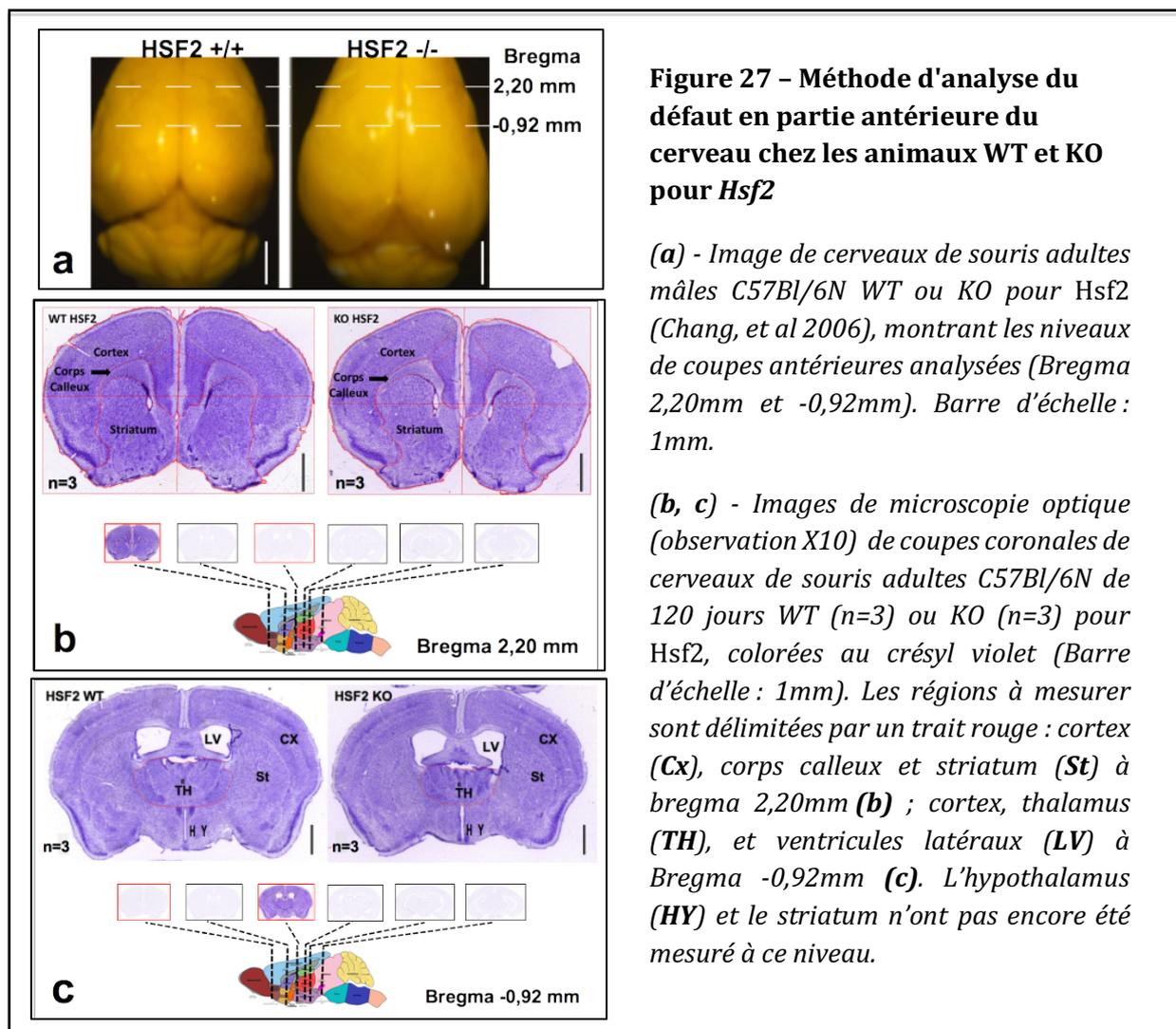
**C- Niveaux de coupes Bregma correspondants**



niveau de coupe **Figure 20**). Ces deux niveaux de coupes mesurés, et quantifiés se trouvent dans la partie du cerveau qui semble être affinée chez les animaux KO pour *Hsf2* (**Figure 26**). Ceci concorde avec les déformations du cerveau observables chez les souris KO pour HSF2.

## 1.2 Réduction globale de la surface des structures des coupes antérieures en absence du facteur HSF2.

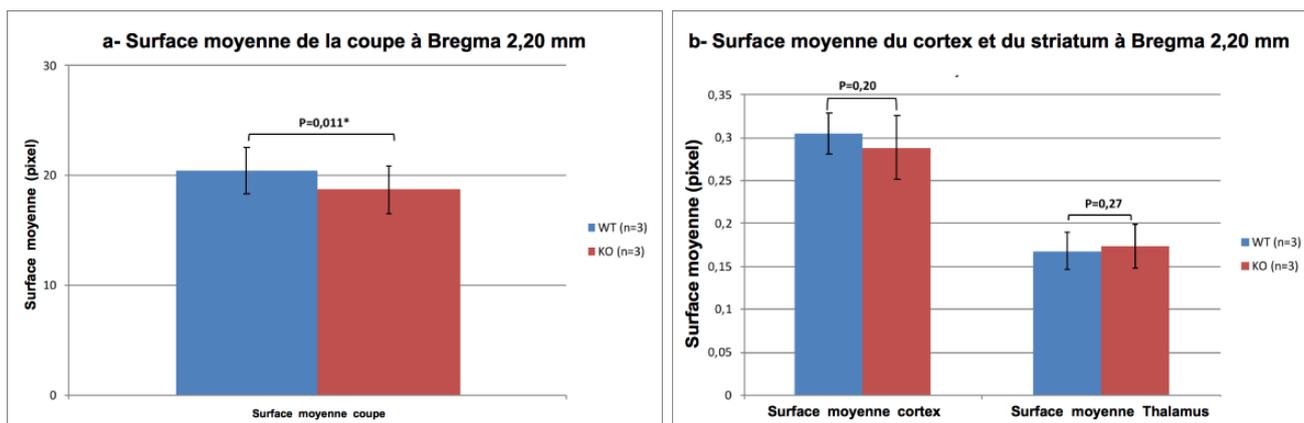
Au niveau de coupe bregma 2,20mm les structures pouvant être impliquées dans le phénotype sont le cortex, le corps calleux, et le striatum. Au niveau de coupe bregma -0,92mm, les structures principales pouvant être impliquées sont le cortex, le striatum, et par conséquent les ventricules, le thalamus, et l'hypothalamus (**Figure 27**). J'ai donc mesuré ces structures à ces deux niveaux de coupes, pour identifier et analyser de façon quantitative les structures qui pourraient être à l'origine de la réduction de la surface du cerveau en partie antérieure.



**Figure 27 – Méthode d'analyse du défaut en partie antérieure du cerveau chez les animaux WT et KO pour *Hsf2***

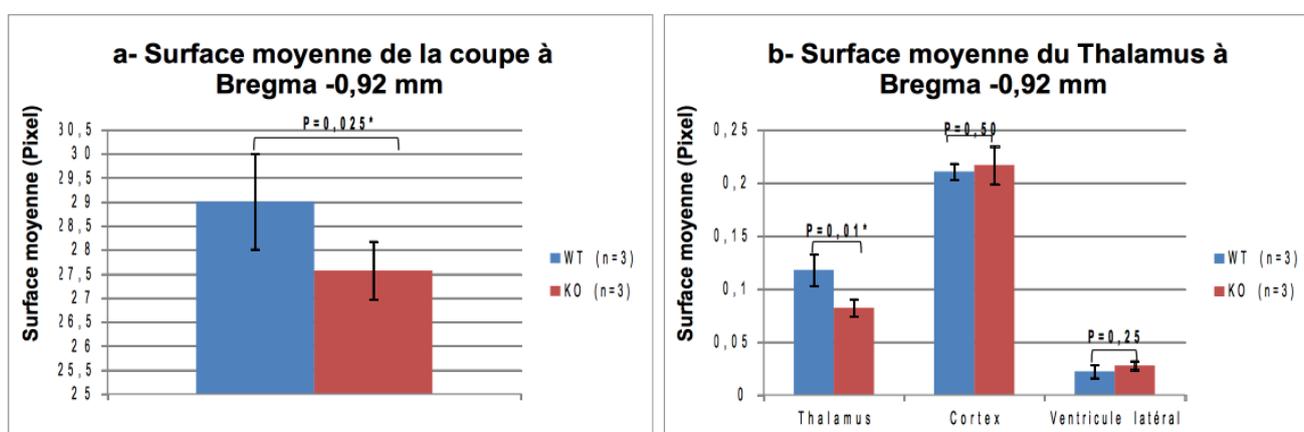
(a) - Image de cerveaux de souris adultes mâles C57Bl/6N WT ou KO pour *Hsf2* (Chang, et al 2006), montrant les niveaux de coupes antérieures analysées (Bregma 2,20mm et -0,92mm). Barre d'échelle : 1mm.

(b, c) - Images de microscopie optique (observation X10) de coupes coronales de cerveaux de souris adultes C57Bl/6N de 120 jours WT (n=3) ou KO (n=3) pour *Hsf2*, colorées au crésyl violet (Barre d'échelle : 1mm). Les régions à mesurer sont délimitées par un trait rouge : cortex (Cx), corps calleux et striatum (St) à bregma 2,20mm (b) ; cortex, thalamus (TH), et ventricules latéraux (LV) à Bregma -0,92mm (c). L'hypothalamus (HY) et le striatum n'ont pas encore été mesuré à ce niveau.



**Figure 28 - HSF2 ne modifie pas la taille globale du cortex, ni du striatum à bregma 2,20mm**

*(a-b) Quantification des surfaces moyennes des coupes (a, p=0,011), du cortex (b, p=0,20) et du striatum (b, p=0,27), au niveau antérieur frontal à Bregma 2,20mm chez les souris adultes mâles (120jours) C57Bl/6N WT (bleu, n=3) ou KO (rouge, n=3) pour Hsf2 (cf. figure 27). Statistiques : t-test, barres d'erreur : écart moyen. Ni la surface du cortex, ni celle du striatum n'est significativement modifiée entre la souris sauvage et la souris KO pour Hsf2 .*



**Figure 29 - Réduction de la surface du thalamus à bregma -0,92mm**

*(a-b) Quantification des surfaces moyennes des coupes (a, p=0,025), du thalamus (b, p=0,01), du cortex (b, p=0,50), et des ventricules latéraux (b, p=0,25), au niveau antérieur frontal à Bregma -0,92 mm, chez les souris adultes mâles (120jours) C57Bl/6N WT (bleu, n=3) ou KO (rouge, n=3) pour Hsf2 (cf. figure 27). Statistiques : t-test, barres d'erreur : écart moyen. Réduction significative de la surface de la coupe (a). Aucune réduction significative du cortex, ni des ventricules latéraux chez les souris KO pour Hsf2. Réduction significative de la surface moyenne du thalamus (b).*

La mesure de la surface du cortex au niveau de coupe Bregma 2,20mm montre qu'il y a, à nouveau, une tendance vers une diminution de la surface globale du cortex à ce niveau de coupe, chez les animaux KO pour *Hsf2* (**figure 28**). Cette différence n'est pas significative, bien que la mesure de la surface de la coupe à ce niveau soit significativement réduite chez les souris KO pour *Hsf2*. La mesure du striatum montre que sa surface n'est pas non plus affectée par l'absence de HSF2 sur cet échantillon. Ceci suggère que soit c'est le corps calleux qui est impliqué dans la réduction de la surface de la coupe, soit que toutes les structures sont faiblement réduites, sans qu'une structure particulière ne soit plus affectée qu'une autre. Il restera donc à compléter cette analyse par la mesure du corps calleux pour appuyer une de ces hypothèses.

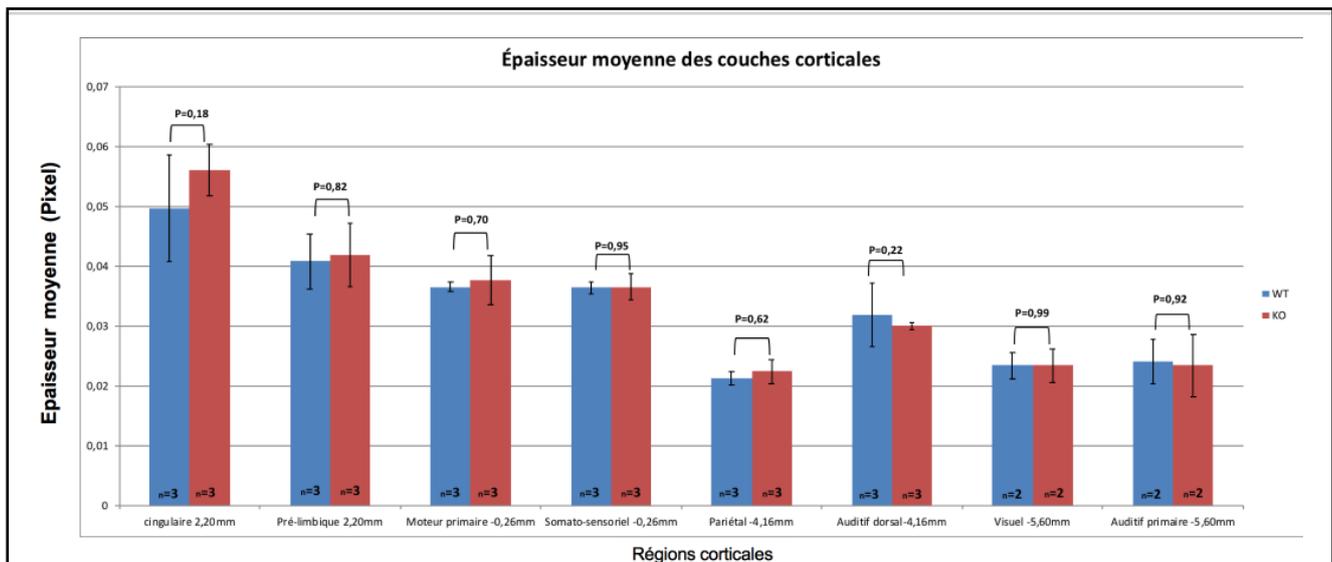
### 1.3 La réduction de la surface du thalamus en absence du facteur HSF2, contribue à l'affinement du cerveau en partie antérieure.

J'ai ensuite analysé le niveau de coupe bregma -0,92mm qui est également significativement réduit en partie antérieure du cerveau. Ces mesures montrent que le cortex n'est pas significativement affecté par l'absence de *Hsf2*. Il en est de même pour les ventricules latéraux qui restent de surface comparable entre les souris WT et les KO *Hsf2*. L'observation des coupes m'a conduite à me focaliser sur la région du thalamus qui paraissait altérée chez les souris KO *Hsf2*, mais qui n'a pas encore été caractérisée chez les souris invalidées pour l'expression du gène *Hsf2*. Ces mesures montrent que la surface du thalamus à ce niveau de coupe (Bregma-0,92mm, **Figure 29**), est significativement inférieure chez les souris KO *Hsf2*. Cette analyse laisse supposer que "l'écrasement" du thalamus, possiblement causé par une perte de neurones dans cette région, ou à un réarrangement de cette région, contribue au rétrécissement de la partie antérieure du cerveau en absence de HSF2. Cette diminution de surface pourrait aussi suggérer une diminution du nombre de neurones au niveau du thalamus.

Néanmoins, pour le moment, je n'ai pas encore mesuré la surface du striatum et de l'hypothalamus à ce niveau de coupe. Nous ne savons donc pas pour le moment si ces structures participent également, à ce phénotype dans la partie antérieure du cerveau.

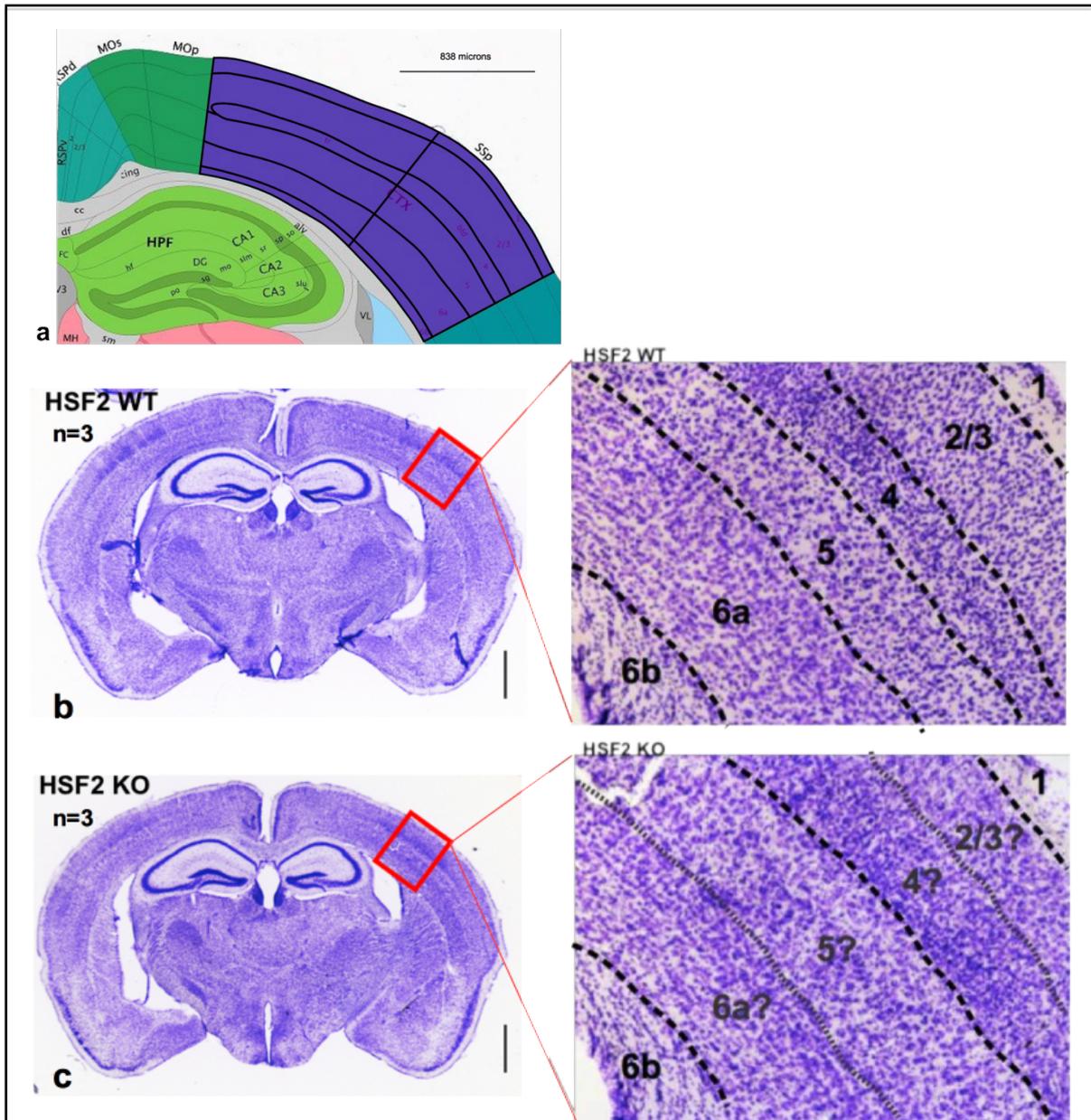
2. L'absence de HSF2 désorganise les couches corticales sans altérer l'épaisseur de l'ensemble des couches.

La surface du cortex antérieur n'étant pas significativement affectée par l'absence du facteur HSF2, et au vu des déformations du cortex déjà observées par l'équipe, j'ai souhaité déterminer si ce phénotype résultait de l'altération de l'épaisseur de la couche corticale dans une aire particulière du cerveau. J'ai donc mesuré l'épaisseur de la couche corticale dans les régions du cortex préfrontal, du cortex moteur primaire, du cortex somatosensoriel, du cortex pariétal, du cortex visuel, du cortex auditif dorsal et auditif primaire, pour couvrir la plupart des aires identifiables de cette structure. Ces mesures montrent des tendances différentes selon les régions d'intérêt, mais aucune différence significative entre les groupes WT et KO n'en ressort (**Figure 30**). Ces données suggèrent que l'absence du facteur HSF2 altère la morphologie du cortex de façon globale, sans que nous puissions détecter de perte de tissus à des niveaux spécifiques du cortex.



**Figure 30 – Les couches corticales ne sont pas affectées en absence de Hsf2**

Quantification des épaisseurs moyennes de différentes régions corticales, chez les souris adultes mâles (120jours) C57Bl/6N WT (bleu, n=3) ou KO (rouge, n=3) pour Hsf2 : cortex cingulaire (2,20mm), pré-limbique (2,20mm), primaire (-0,26mm), somatosensoriel (-0,26mm), pariétal (-4,16 mm), auditif dorsal (-4,16 mm), visuel (-5,60 mm), auditif primaire (-5,60 mm). Statistiques : t-test, barres d'erreur : écart moyen. Aucune altération significative de l'épaisseur des couches corticales dans toutes les régions mesurées.



**Figure 31 - Désorganisation des couches corticales en absence du facteur HSF2**

*(a) Image d'une coupe coronale de souris P56, issue du Brain Atlas, indiquant la région somatosensorielle d'intérêt, et la délimitation des couches corticales*

*(b-c) Images de microscopie optique (observation X10) de coupes coronales de cerveaux de souris adultes C57Bl/6N de 120 jours, colorées au crésyl violet (Barre d'échelle : 1mm). Délimitation des couches corticales de 1 à 6 (de droite à gauche) chez la souris WT (b, n=3) ou KO (c, n=3) pour Hsf2, dans la région somatosensorielle.*

*On observe une confusion entre les couches 2/3 et 4, et une désorganisation de la couche 5 chez le KO pour Hsf2.*

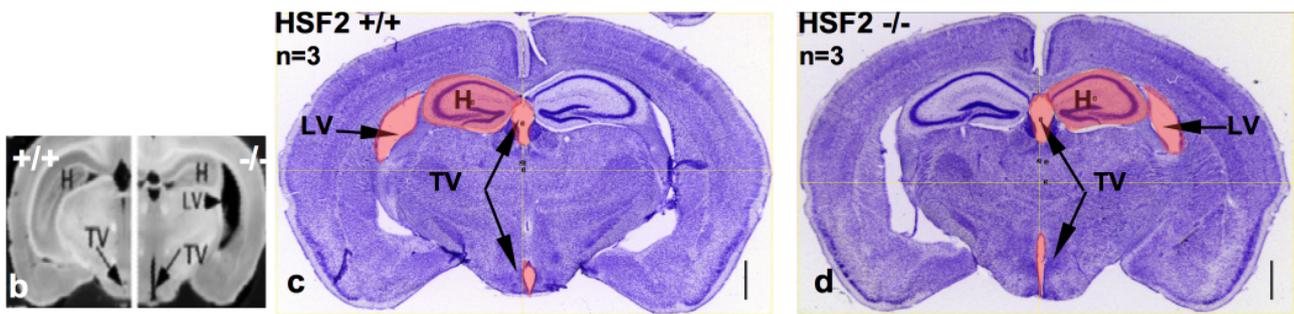
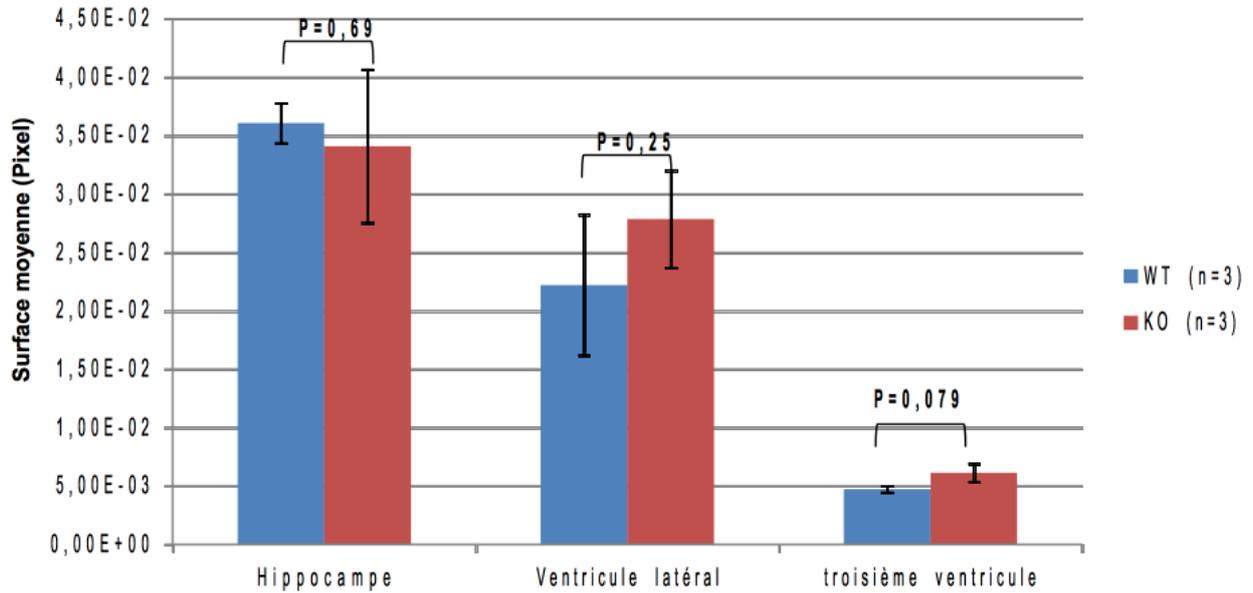
Afin de mieux comprendre le phénotype, j'ai analysé l'organisation cellulaire du cortex cérébral qui permet de distinguer chez un individu sauvage, les six couches corticales. L'organisation des cellules dans les couches du cortex dans la région somatosensoriel, révélée par la coloration au crésyl violet, indique une désorganisation des couches corticales chez les animaux mutants pour HSF2. Les six couches du cortex sont difficilement identifiables chez ce mutant (**Figure 31**). La frontière entre la couche 2/3, et la couche 4 semble confuse, et il en est de même avec celles des couches 5 et 6 qui ne semblent également pas bien délimitées. Chez les souris *Hsf2* KO, les proportions des couches semblent également ne pas être respectées. Le bon arrangement des couches corticales dépend donc de la présence de HSF2. Ces résultats sont en cohérence avec les défauts déjà observés dans l'équipe (Chang et al. 2006). Ils font écho aux défauts de migrations pendant le développement, qui pourraient être responsable de ces désorganisations cellulaires au sein des couches corticales chez l'adulte.

L'ensemble de ces analyses montre que la surface du cortex est relativement préservée chez les animaux mutants, mais que celui-ci est désorganisé au niveau cellulaire, ce qui pourrait entraîner des défauts fonctionnels.

### 3. L'absence du facteur HSF2 n'altère pas la surface de l'hippocampe et des ventricules

Les animaux mutants *Hsf2* se différencient des animaux sauvages par un hippocampe plus petit, et des ventricules plus ouverts (latéral et troisième ventricule). Ces données ont déjà été décrites par l'équipe (Kallio et al. 2002a), mais n'ont pas été quantifiées. J'ai donc mesuré les surfaces des hippocampes et des ventricules dans les deux populations (WT et KO) pour quantifier ces défauts sur les coupes marquées par coloration histologique au crésyl violet. Cette analyse montre que l'absence du facteur HSF2, n'altère ni la taille de l'hippocampe, ni celle des ventricules sur cette série d'animaux (**Figure 32**). En revanche, l'observation des coupes révèle une déformation du troisième ventricule équivalent à ce qui avait déjà été observé (Kallio et al. 2002a). Nous observons sur l'ensemble de nos résultats, des profils allant vers une diminution des surfaces de nombreuses structures en

### a - Surface moyenne de l'hippocampe et des ventricules



### Figure 32 - L'absence de Hsf2 chez les souris KO n'affecte pas la surface des hippocampes

(a) Quantification des surfaces moyennes de l'hippocampe, des ventricules latéraux, et du troisième ventricule, chez les souris adultes mâles (120 jours) C57Bl/6N, WT (bleu, n=3) ou KO (rouge, n=3) pour Hsf2. Statistiques :t-test ; Barres d'erreur : écart moyen. L'absence du facteur HSF2 n'affecte pas la taille des hippocampes et des ventricules (latéraux et troisième ventricule) chez les souris adultes KO pour Hsf2.

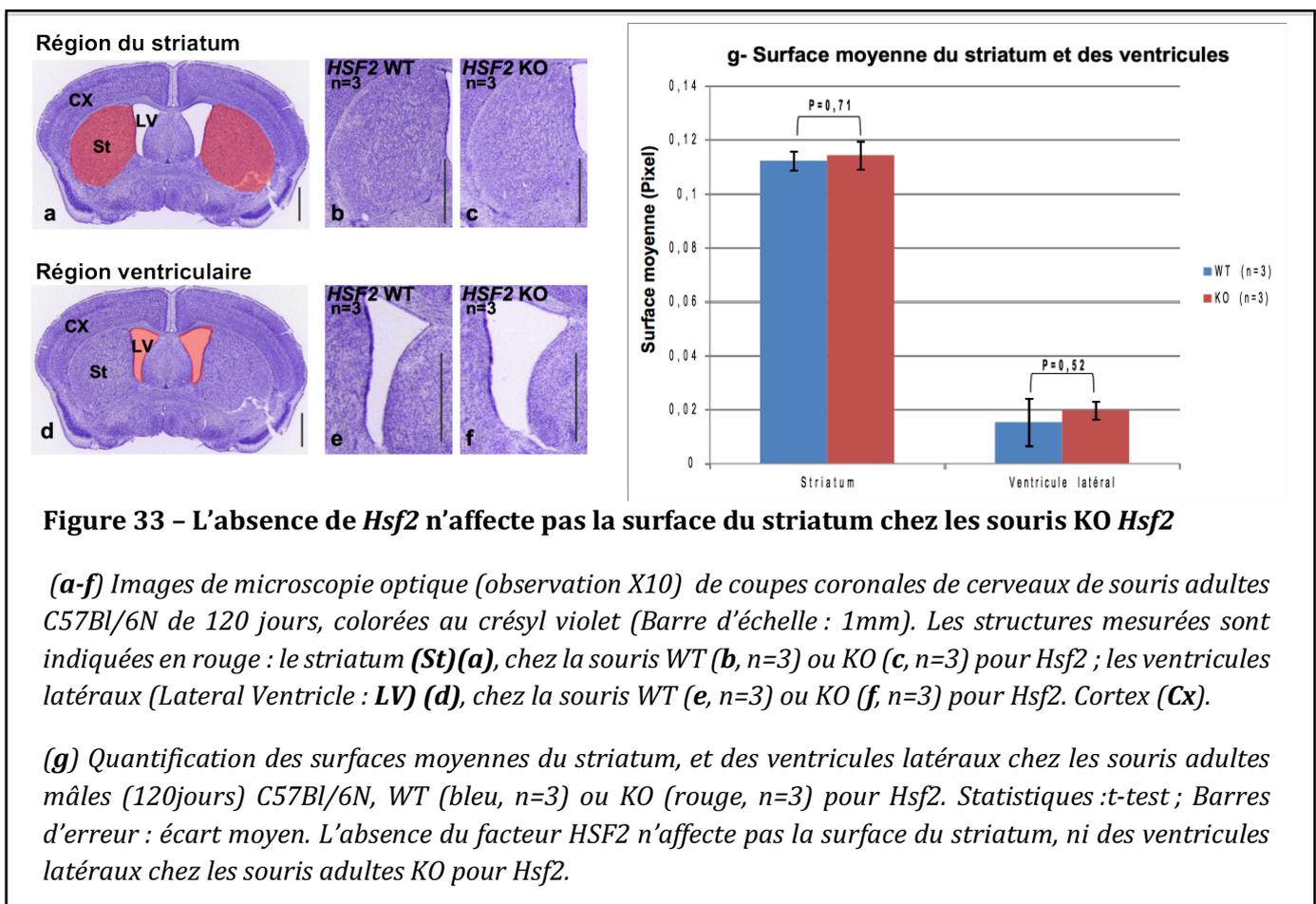
(b) Image d'une coupe coronale de souris adulte P90 (Kallio et al, 2002), suggérant une diminution de la surface des hippocampes, un élargissement des ventricules latéraux, et du troisième ventricule en absence de Hsf2.

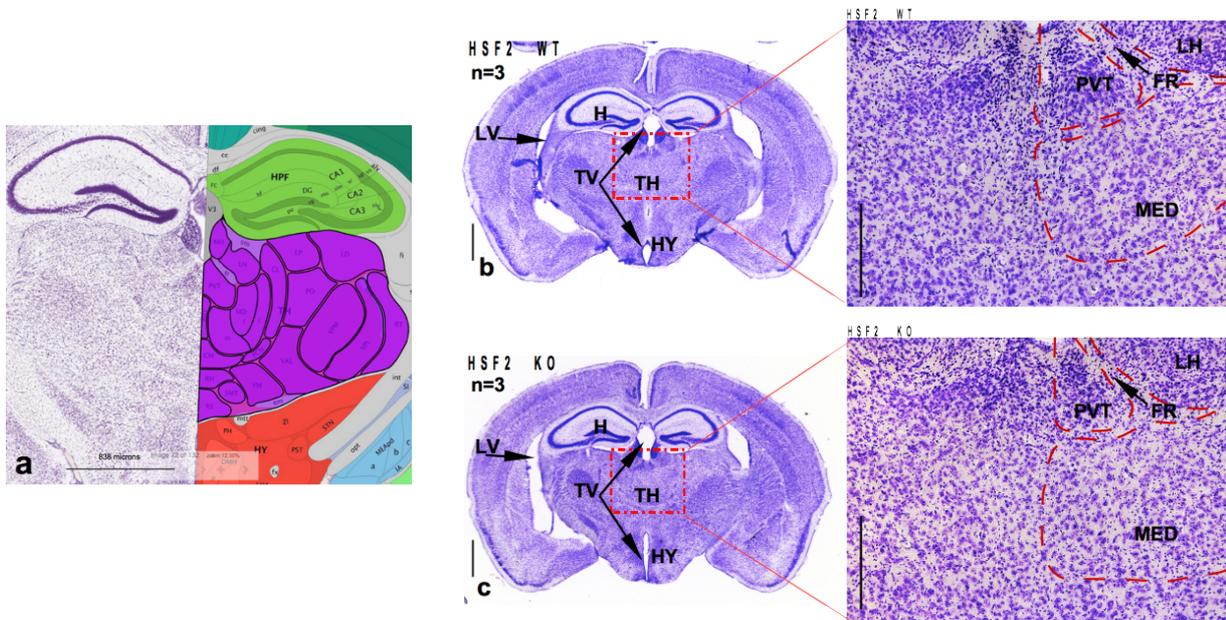
(c-d) Images de microscopie optique (observation X10) de coupes coronales de cerveaux de souris adultes C57Bl/6N de 120 jours, colorées au crésyl violet (Barre d'échelle : 1mm), chez la souris WT (c, n=3) ou KO (d, n=3) pour Hsf2. Les structures mesurées sont marquées en rouge : Hippocampe (H) ; Third Ventricle (TV) ; Lateral Ventricle (LV). On observe une déformation du troisième ventricule (TV) similaire à ce qui a pu être observé précédemment dans l'équipe (b).

absence de *Hsf2*. Ceci pourrait suggérer que des défauts de surfaces existent, bien qu'ils ne soient pas assez importants sur cet échantillonnage pour pouvoir être quantifiés.

#### 4. L'absence du facteur HSF2 n'altère pas la surface du striatum et des ventricules latéraux

La littérature ne fait pas mention d'une altération de la taille du striatum chez la souris adulte en absence du facteur HSF2 cependant les défauts observés sur les coupes antérieures, où le striatum est très présent, m'ont incitée à analyser cette structure. Afin d'identifier si cette structure est affectée chez les souris *Hsf2* KO, j'ai donc procédé de la même façon en mesurant leur surface sur des coupes équivalentes entre les animaux WT (n=3) et les animaux KO pour *Hsf2* (n=3). La mesure de la surface du striatum montre que sa surface n'est pas affectée chez les souris *Hsf2* KO par rapport aux animaux sauvages (**Figure 33**). La taille des ventricules, à ce même niveau de coupe n'est pas non plus affectée en absence du facteur HSF2. L'absence de HSF2 n'affecte donc pas, ni le striatum, ni les ventricules latéraux dans cet échantillon.



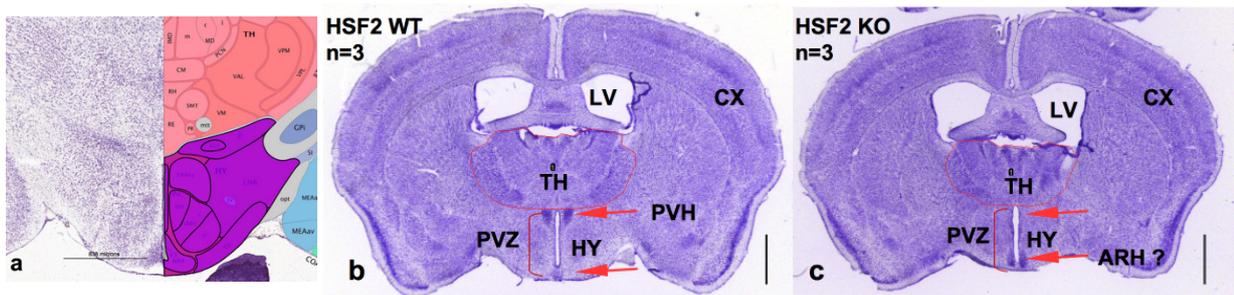


**Figure 34 – Désorganisation de la structure du thalamus**

(a) Image d'une coupe coronale de souris P56, issue du Brain Atlas, indiquant en violet la structure du thalamus, et ses sous-structures

(b) Images de microscopie optique (observation X10) de coupes coronales de cerveaux de souris adultes C57Bl/6N de 120 jours, colorées au crésyl violet (Barre d'échelle : 1mm coupe entière, et 0,25mm panneau d'agrandissement). Délimitation de la région du thalamus analysée, et de ses sous-structures, par un trait rouge chez les souris WT (b, n=3), et KO (c, n=3) pour Hsf2 : Hippocampe (H), Ventricule Latéral (LV), Troisième Ventricule (TV), Hypothalamus (HY), Thalamus (TH), Fasciculus retroflexus (FR), Lateral Habenula (LH), Medial group of the dorsal thalamus (MED), Paraventricular nucleus of thalamus (PVT)

On observe une confusion des sous-structures du thalamus



**Figure 35 – Désorganisation des sous-structures de l'hypothalamus**

(a) Image d'une coupe coronale de souris P56, issue du Brain Atlas, indiquant en violet la structure de l'hypothalamus, et ses sous-structures

(b) (c) Images de microscopie optique (observation X10) de coupes coronales de cerveaux de souris adultes C57Bl/6N de 120 jours, colorées au crésyl violet (Barre d'échelle : 1mm). Délimitation de la région analysée de l'hypothalamus (HY), et de ses sous-structures, par des marques rouges chez les souris WT (b, n=3), et KO (c, n=3) pour Hsf2 : zone périventriculaire (PVZ), noyau hypothalamique paraventriculaire. (PVH), noyau hypothalamique arqué (ARH). Thalamus (TH), Cortex (CX), Ventricule latéral (LV).

On observe une désorganisation des noyaux hypothalamiques (PVH et ARH)

### 5. Désorganisation de sous-régions du diencéphale : thalamus et hypothalamus

De façon plus générale, j'ai pu observer que l'organisation de l'ensemble des structures du cerveau semble être perturbée par l'absence du facteur HSF2. Non seulement, les couches corticales sont désorganisées en absence du facteur HSF2, mais également les structures sous-jacentes qui projettent vers, et participent au fonctionnement normal du cortex cérébral semblent perturbées. Au vu de ces résultats, j'ai voulu mettre en évidence plus finement ces défauts cellulaires en analysant leurs organisations cellulaires au niveau du thalamus, dont la surface est réduite chez les souris *Hsf2 KO*. L'observation des coupes semble montrer une désorganisation du thalamus. Le noyau paraventriculaire du thalamus (**PVT**), et l'habenula latéral (**LH**) normalement séparés par le fasciculus retroflexus (fibres nerveuses), ne sont plus aussi distincts chez les souris KO (**Figure 34**). Il semble aussi que les neurones de la région du groupe médian dorsal du thalamus (**MED**) soient moins organisés chez les souris *Hsf2 KO* par rapport au WT. Il semble aussi que les corps cellulaires soient moins denses dans cette sous-structure. Ces analyses, encore préliminaires, vont être complétées par des comptages de cellules, notamment dans le MED, afin de déterminer s'il y a, ou non, un nombre moins important de neurones.

Comme observé sur d'autres structures, l'organisation de l'hypothalamus, semble aussi être bouleversée dans la zone périventriculaire (**PVZ**, **Figure 35**). Le noyau hypothalamique para ventriculaire (**ARH**), composante de la zone périventriculaire n'apparaît plus chez les animaux *Hsf2 KO*. Par contre, l'apparition d'une structure d'apparence similaire dans l'extrémité basse de la zone périventriculaire est inhabituelle à ce niveau de coupe du cerveau.

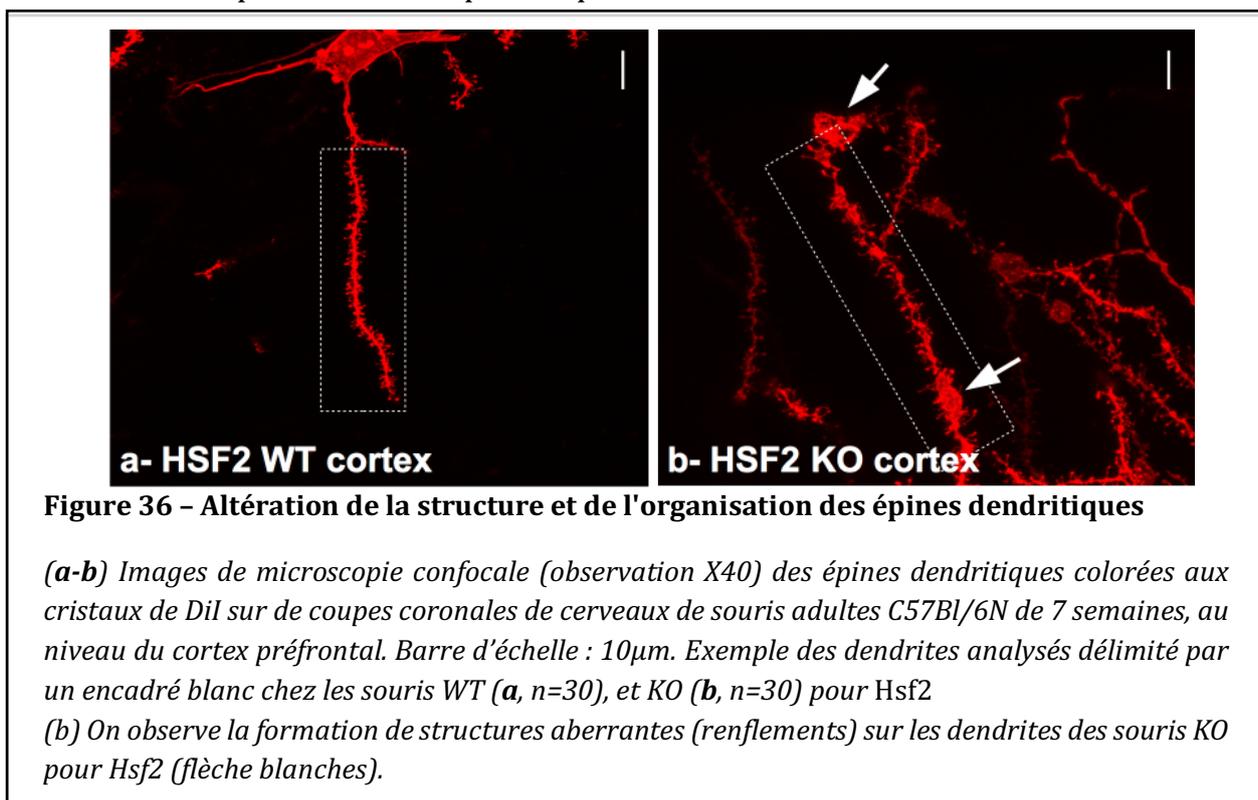
## II. Altérations dendritiques induites par l'absence du facteur HSF2 dans le cerveau adulte

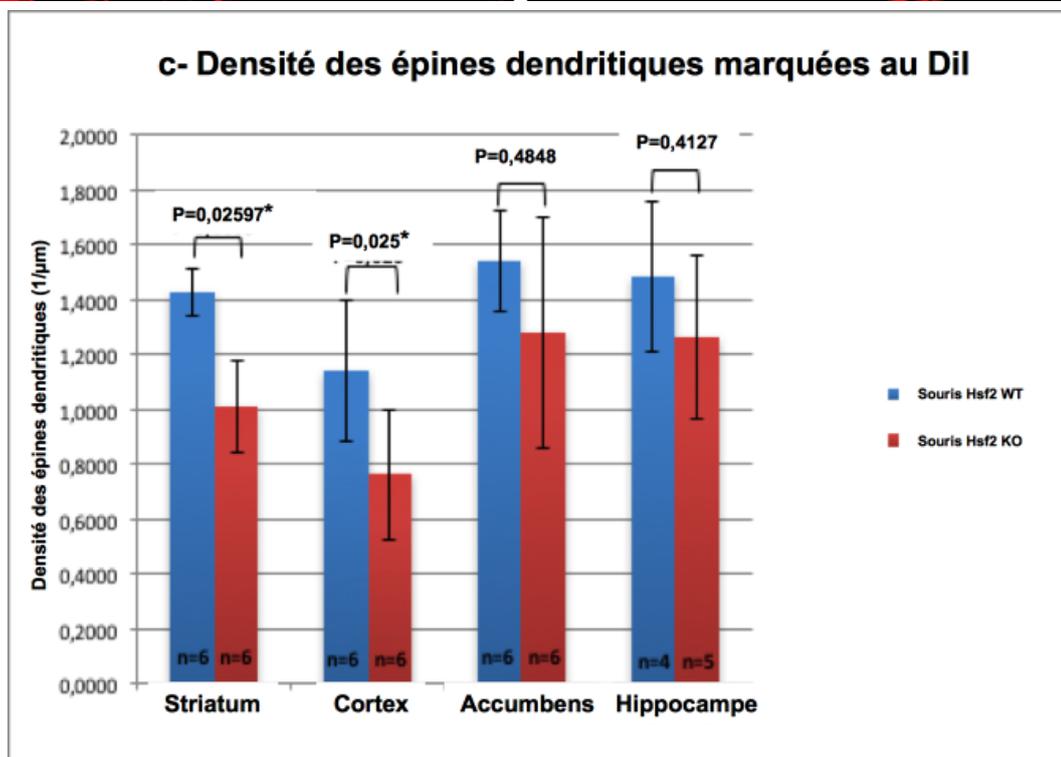
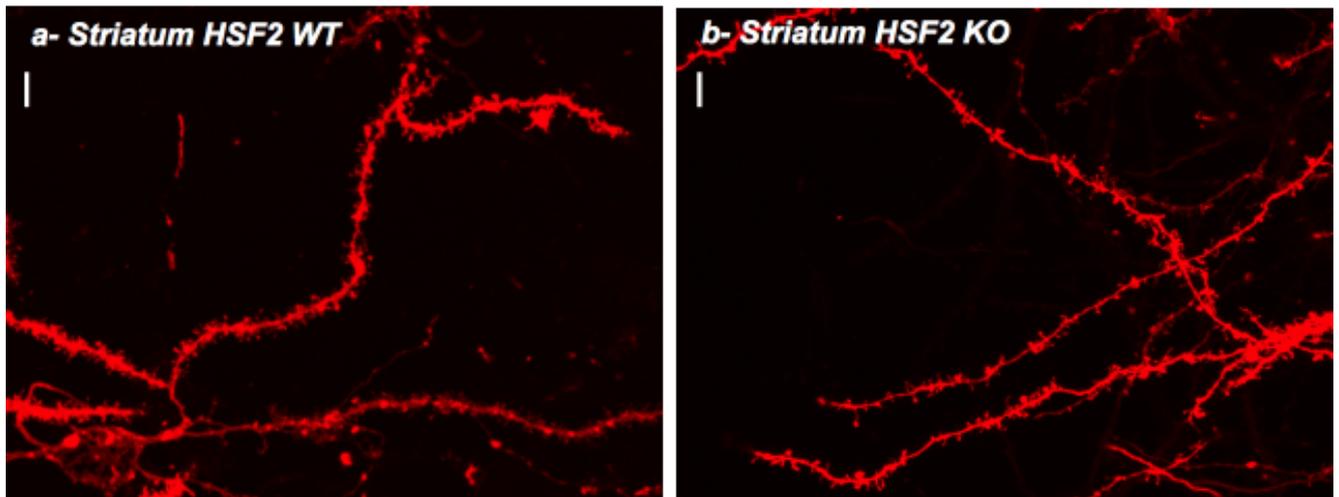
### 1. L'absence de HSF2 favorise des malformations structurelles des dendrites

Nous avons observé, dans des expériences d'exposition à des drogues, des défauts comportementaux chez les animaux mutants pour *Hsf2* suite à l'exposition à des drogues, l'amphétamine ou l'alcool, induisant une sensibilisation des réponses locomotrices. Les

défauts de sensibilisation chez les animaux sont intéressants à étudier et l'hypothèse la plus communément admise est que les bases neurales (et moléculaires) de ces défauts sont communes aux processus d'addiction (Camarini et Pautassi 2016). Pour cette raison, nous avons cherché à déterminer si l'intégrité de structures pertinentes était affectée chez nos animaux, notamment celles des circuits dopaminergiques mésocorticolimbiques du circuit de la récompense. Parmi les effets associés à la sensibilisation, des altérations des dendrites, et de la densité des épines dendritiques, ont été montrés (Robinson et Kolb 1999; Shen et al. 2009). J'ai donc analysé les épines dendritiques par un marquage au Dil chez des animaux de 7 semaines dans le striatum, le noyau accumbens, et le cortex préfrontal qui sont les régions qui reçoivent des afférences dopaminergiques impliquées dans les circuits motivationnels chez l'animal (circuit de la récompense) (Nieoullon et Coquerel 2003). J'ai également analysé les épines dendritiques dans la couche CA1 de l'hippocampe, une région aussi impliquée dans ce circuit.

D'un point de vue morphologique, la coloration au Dil des dendrites montre que les animaux mutants sont affectés par l'absence de HSF2. Les dendrites sont désorganisées par rapport à celles des animaux sauvages (**Figure 36**). Certaines dendrites montrent des déformations structurales importantes en absence de HSF2, en particuliers des zones d'élargissements inhabituelles (boursouflures, flèches blanches **Figure 36**). Cette observation n'a pour le moment pas été quantifiée.





**Figure 37 – Hypodensité des épines dendritiques en absence de HSF2**

*(a-b) Images de microscopie confocale (observation X40) montrant un exemple de dendrite analysé au niveau du striatum, sur des coupes coronales de cerveaux de souris adultes C57Bl/6N de 7 semaines, colorées aux cristaux de Dil, chez la souris WT (a, n=6) ou KO (b, n=6) pour Hsf2. Barre d'échelle : 10µm.*

*(c) Quantification des densités des épines dendritiques (densité= 1/µm), chez les souris adultes mâles (7 semaines) C57Bl/6N, WT (bleu, n=6) ou KO (rouge, n=6) pour Hsf2 au niveau des régions du striatum (p. value=0,02597), du cortex préfrontal (p. value=0,025), de la coquille du noyau Accumbens (NAc Shell, p. value=0,4848), et de la région CA1 de l'hippocampe (p. value=0,4127). Statistiques : test Wilcoxon ; Barres d'erreur : écart type.*

*La diminution de la densité des épines dendritiques est significative dans le striatum et le cortex préfrontal.*

## 2. La densité des épines dendritiques diminue en absence de HSF2

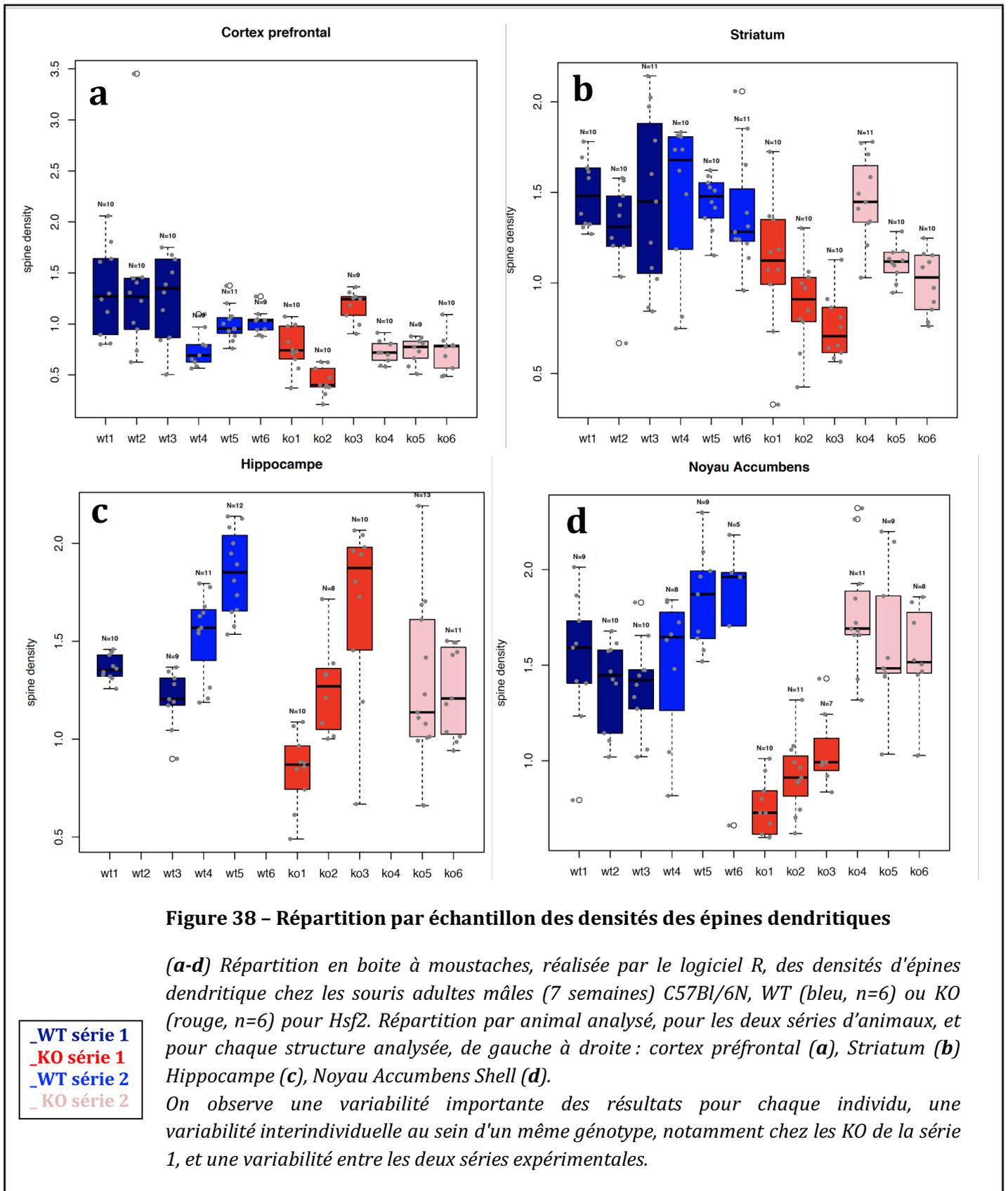
Afin de mettre en évidence les défauts neurologiques induits par l'absence de HSF2 au niveau de la structure cellulaire, nous avons quantifié la densité des épines dendritiques. J'ai donc analysé 6 cerveaux adultes mâles sauvages et 6 mutants *Hsf2*, en deux séries distinctes d'animaux (3 animaux par série) grâce au logiciel NeuroLucida qui analyse de façon semi-automatique les épines dendritique (exemple d'analyse, **Figure 37**). Dix dendrites ont été quantifiées par structures d'intérêt (striatum, cortex, et noyau accumbens). Pour l'hippocampe qui est une structure plus fragile et facilement dommageable, j'ai pu analyser 4 animaux sauvages et 5 animaux mutants pour HSF2. Les résultats pour cette structure devront être complétés.

Globalement, ces analyses montrent que le nombre d'épines dendritiques est affecté par l'absence du facteur HSF2 (**Figure 37**). La densité moyenne des épines semble diminuée chez ces animaux mutants au niveau du NAc et de l'hippocampe, mais cette diminution n'est pas statistiquement significative ( $p > 0.05$ ). Elle est, en revanche, diminuée de façon significative au niveau du striatum et du cortex.

Les résultats sur ces deux séries d'animaux indépendants montrent une grande variabilité de la moyenne des densités d'épines dendritiques au sein d'une même structure et entre les deux séries.

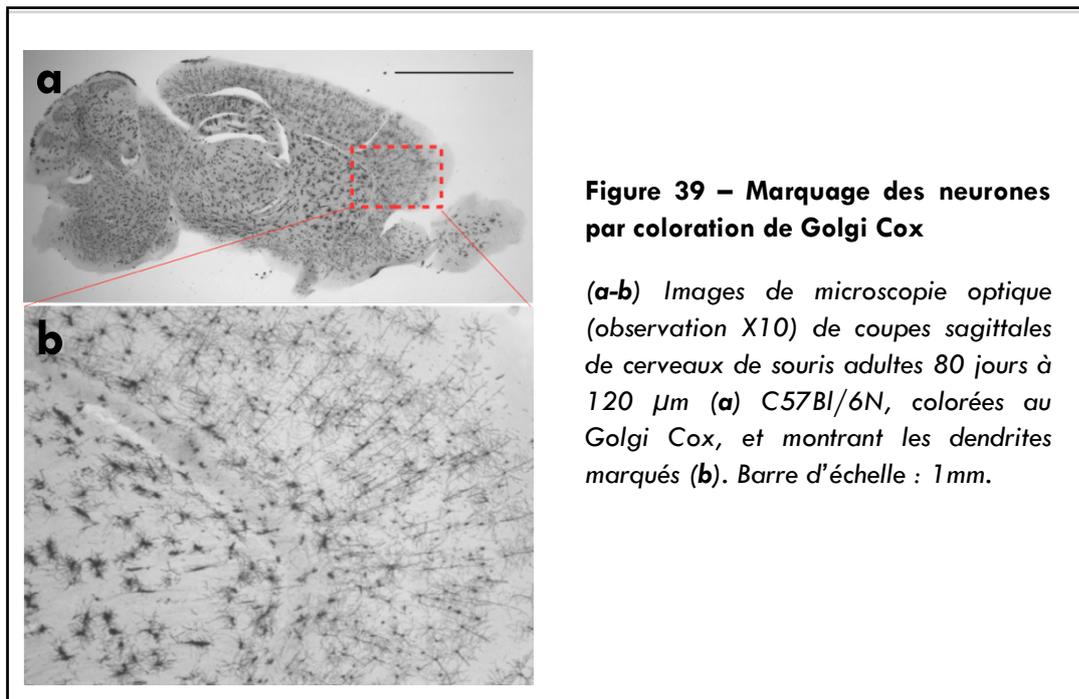
Pour rendre compte de la répartition des données au sein de notre échantillon et réaliser un test statistique adapté aux petits échantillons, nous avons analysé nos données grâce au logiciel statistique R. La représentation statistique en « boîte à moustache » des données par animal confirme que les densités des épines dendritiques sont très variables pour le même animal, et au sein de chaque structure. Les densités des épines dendritiques sont très dépendantes de chaque individu. Cette variabilité est d'autant plus évidente pour l'hippocampe et le noyau accumbens pour lesquels les statistiques ne montrent pas de variations significatives. Cette analyse montre aussi qu'il existe une variabilité entre les deux séries d'animaux étudiées.

Néanmoins, les deux séries d'animaux traitées ensemble ou indépendamment donnent des résultats équivalents, c'est à dire que la densité des épines dendritiques diminue



toujours en absence de HSF2 (**Figure 38**). Cela consolide la conclusion que le facteur HSF2 est important pour la densité des épines dendritiques.

Pour confirmer ces résultats, nous réalisons les mêmes expériences de quantification avec une technique de marquage différente (**Figure 39**). Nous avons déjà mis au point des marquages des neurones par une coloration Golgi-Cox sur 3 animaux sauvages et 3 animaux KO (réalisés par Véronique Dubreuil, chercheur maître de conférences dans l'équipe). Ces marquages doivent maintenant être analysés et quantifiés.



### III. Implication du facteur HSF2 sur la population neuronale dans le cerveau de souris adulte.

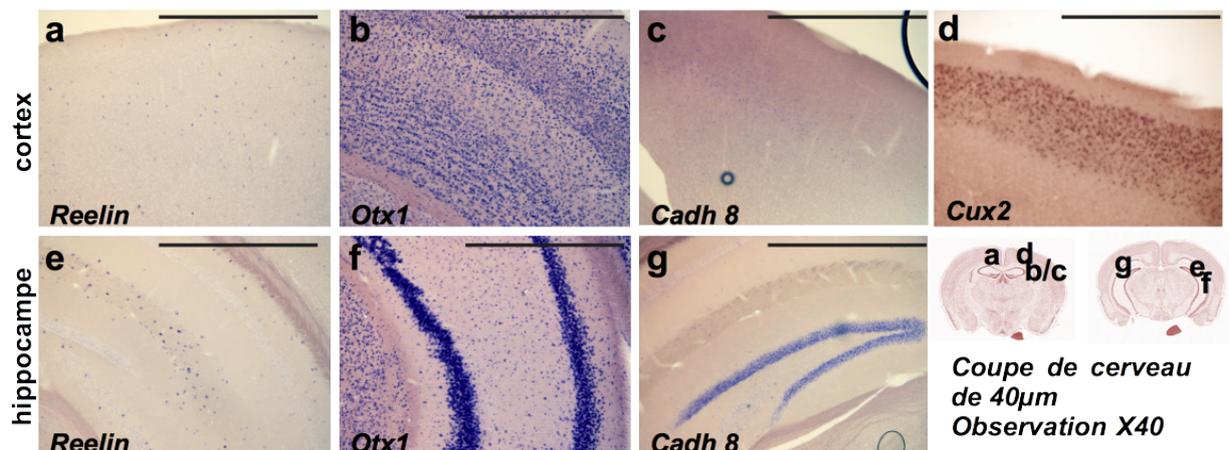
#### 1. Mise au point du protocole d'Hybridation *in situ* sur coupes flottantes

Nous souhaitons caractériser les défauts d'organisation des couches observés par la coloration au crésyl violet, en marquant spécifiquement certaines d'entre elles. L'analyse de marqueurs spécifiques de couches, ou de populations neuronales spécifiques, vise à mettre en évidence la façon dont la population de neurones est affectée ou non par l'absence de HSF2. En utilisant la technique de marquage par hybridation *in situ*, HIS, nous

pouvons identifier la localisation des cellules qui expriment le gène marqueur (on révèle la présence des ARNm), puis réaliser un comptage des neurones positivement marquées, ou analyser spécifiquement la zone de répartition des cellules qui expriment ce gène marqueur.

Marquer par HIS des coupes de cerveau se fait en général en coupant le cerveau en sections fines d'une dizaine de micromètres, et en les déposant directement sur une lame. Facilement réalisable pour l'analyse de tissus embryonnaires de petites tailles, cette technique permet d'obtenir un marquage de très bonne qualité, ainsi qu'une résolution cellulaire. Du fait du volume plus important du cerveau chez la souris adulte, réaliser des coupes fines de qualité est très délicat et par ailleurs, nous souhaitons réaliser des coupes épaisses. Nous avons donc trouvé un compromis entre l'épaisseur des coupes et la qualité des coupes, en décidant de travailler avec des coupes flottantes. Cette technique consiste à couper les tissus avec une épaisseur relativement importante (40 $\mu$ m), et à réaliser le marquage par immersion des coupes dans les différentes solutions de marquage. L'avantage ici est de pouvoir obtenir des coupes de cerveau de souris adulte de qualité, préservées dans leur totalité et également de pouvoir stocker ces coupes avant analyse.

J'ai d'abord mis au point la technique d'HIS pour nos applications. J'ai testé le marquage HIS à partir de coupes réalisées au vibratome en comparaison des coupes réalisées au cryostat. Le vibratome nous permet de réaliser des coupes semi-épaisses directement après fixation alors que le cryostat nécessite une étape de cryoprotection. La différence principale réside dans la possibilité de conserver l'échantillon, puis les coupes réalisées à long terme avec le cryostat, alors qu'avec le vibratome il faut réaliser les coupes dans un délai assez rapide puis marquer celles-ci quasi immédiatement, sinon les ARNm qui sont fragiles se dégradent rapidement. J'ai tenté différentes méthodes d'inclusion des blocs des cerveaux (gélatine ou OCT), et différentes techniques de congélation pour couper au cryostat. Enfin, j'ai optimisé et systématisé les étapes de manipulation des coupes (tri, lavage, marquage des coupes etc...), qui sont des étapes sensibles de l'expérimentation, susceptibles d'endommager ou de perdre des coupes, donc des structures d'intérêts.



**Figure 40 – Hybridation *In-Situ* de populations neuronales spécifiques sur des coupes de souris sauvages.**

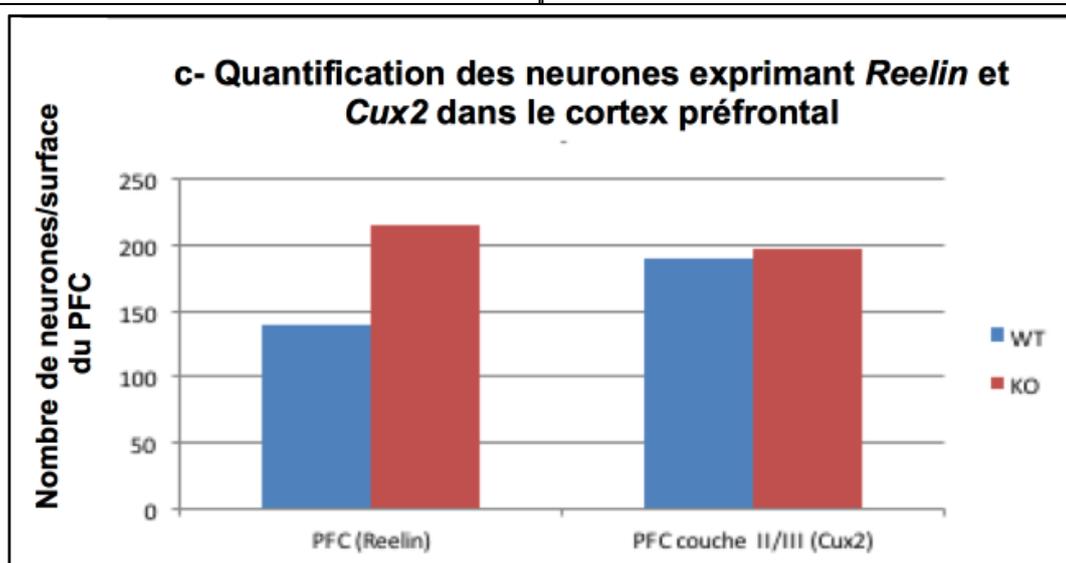
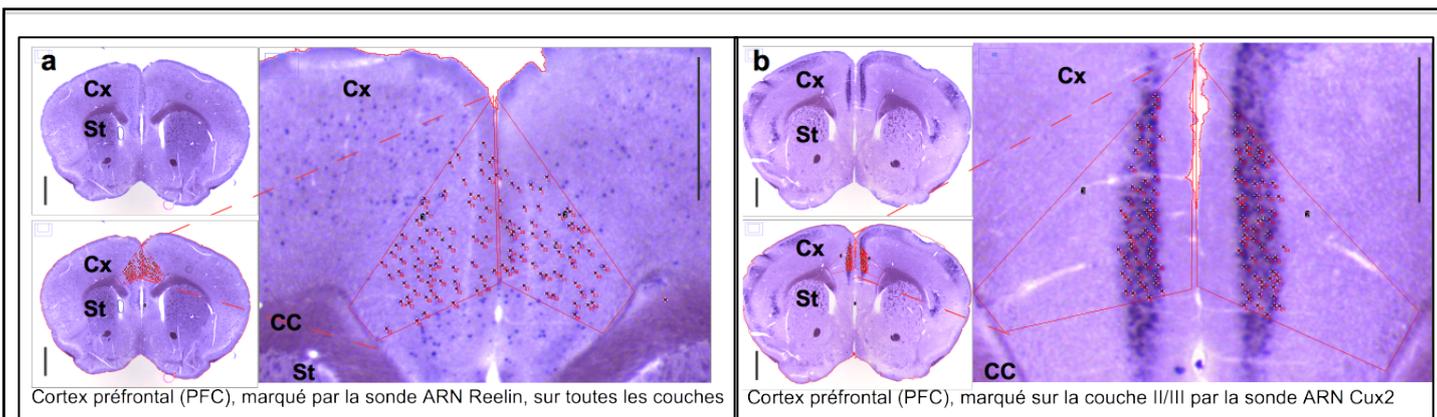
*(a-g) Images de microscopie optique (observation X40) d'hybridation in situ (HIS) sur coupes coronales de cerveaux de souris mâles adultes C57Bl/6N sauvages de 120 jours. Barre d'échelle : 0,5mm. HIS avec des sondes ARN spécifiques de différentes couches corticales et de l'hippocampe. Marquage spécifique des neurones inhibiteurs (GABAergique) dans le cortex moteur (a) et dans les couches stratums et pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe (e) par la sonde Reelin. Marquage des couches profondes V et VI dans le cortex somatosensoriel (b), et de la couche pyramidale des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe (f) par la sonde Otx1. Marquage des couches III, IV et V au niveau du cortex somatosensoriel (c), et marquage de l'hippocampe au niveau du gyrus denté (g) par la sonde Cadherine 8. Marquage des couches II, III, IV dans le cortex somatosensoriel par la sonde Cux2 (d).*

J'ai d'abord mis au point la technique d'HIS, avec des sondes ARN, sur des coupes de souris adultes sauvages que j'ai préparées. Les quatre sondes ARN générées (*Reelin*, *Otx1*, *Cad8*, *Cux2*), permettent de marquer des types de neurones ou des couches spécifiques du cortex. Le gène *Reelin* s'exprime dans les neurones inhibiteurs (GABAergique) ce qui permettra de déterminer si le ratio de neurones inhibiteurs est équivalent chez les animaux WT et *Hsf2 KO*. Il s'agit d'un paramètre important dont l'intégrité est souvent altérée dans les maladies neurologiques (Chang et al. 2006).

Il a également été mis en évidence qu'au cours du développement du cerveau de souris Reeler (mutation du gène *Reelin*), la séparation en deux couches de la plaque corticale ne se fait plus correctement. Cela conduit à une désorganisation des couches corticales, un phénotype proche de ce que nous avons pu observer chez les souris *Hsf2 KO*. Les tests de marquage que j'ai fait sur le modèle murin adulte sauvage que nous utilisons, avec la sonde *Reelin* montre des cellules positives éparpillées dans l'ensemble du cerveau dont l'ensemble du cortex (distribution en poivre et sel), comme attendu pour les neurones GABAergiques (**Figure 40a et 40e**).

La sonde *Otx1*, qui est un marqueur des couches corticales V et VI (Frantz et al. 1994) montre, sur ces expériences, un marquage des couches profondes et permet de distinguer les différentes couches corticales (**Figure 40b**). *Cadh8* est spécifique de la couche V dans le néocortex et des couches II/III et IV dans le cortex moteur et visuel (Nakagawa, Johnson, et O'Leary 1999). L'HIS réalisée montre que la sonde *Cadh8* marque les couches II/III de façon clairsemée et la couche IV de façon plus diffuse (**Figure 40c**). Enfin sur ces expériences, la sonde *Cux2*, marqueur des couches II, III, et IV (Nieto et al. 2004), révèle précisément ces couches avec un signal très fort (**Figure 40 d**).

Ces gènes s'expriment également dans différentes régions du cerveau, autres que le cortex. Le striatum est marqué par les sondes *Reelin*, *Otx1* et *Cux2*. Les sondes *Reelin*, *Otx1*, et *Cadh8* marquent différentes régions de l'hippocampe, avec des marquages plus



**Figure 41 – Hybridation in situ sur coupes de cerveau au niveau du cortex préfrontal (PFC).**

(a-b) Images de microscopie optique (observation X10) d'hybridation in situ (HIS) sur coupes coronales de cerveaux de souris mâles adultes C57Bl/6N sauvages de 120 jours. Barre d'échelle : 1mm coupe entière et 0,5mm panneau d'agrandissement. Les régions analysées sont délimitées par des marques rouges, montrant la méthodologie pour le comptage des neurones marqués dans la région d'intérêt du cortex préfrontal : neurones spécifiques inhibiteurs (GABAergiques) dans le cortex préfrontal par la sonde ARN *Reelin* (a) ; neurones spécifiques de la couche II/III du cortex au niveau préfrontal avec la sonde ARN *Cux2* (b). Cortex (Cx), Striatum (St), Corps Calleux (CC).

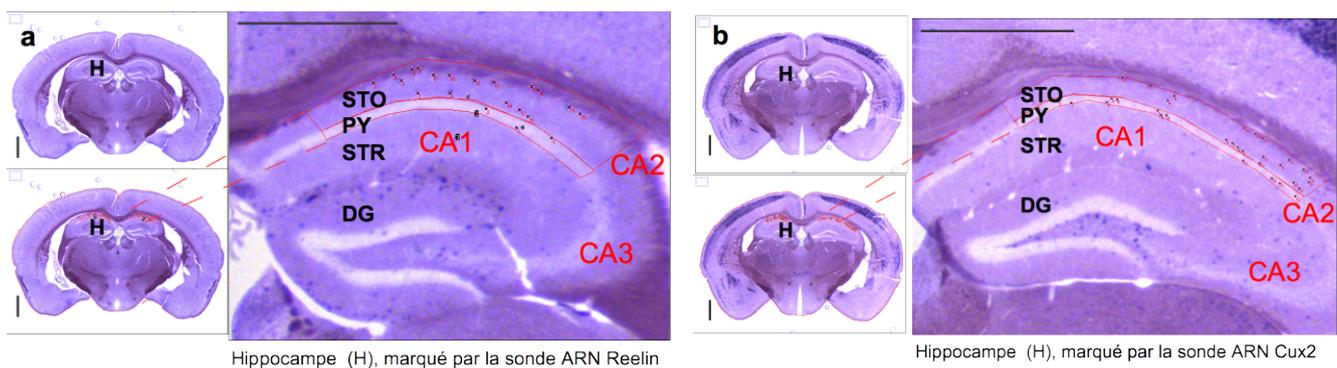
(c) Quantification de la densité des neurones spécifiques inhibiteurs (GABAergiques) dans le cortex préfrontal par la sonde ARN *Reelin* (à gauche) ; quantification de la densité des neurones spécifiques de la couche II/III du cortex au niveau préfrontal avec la sonde ARN *Cux2* (à droite), chez les souris adultes WT (bleu, n=1) ou KO (rouge, n=1) pour *Hsf2*.

prononcés sur certaines sous-structures. La couche stratum de l'hippocampe est marquée par la sonde *Reelin* (**Figure 40e**). Les couches pyramidales de l'hippocampe sont marquées par *Reelin*, *Otx1* et *Cadh8*. Enfin, le gyrus denté est marqué par *Otx1* et *Cadh8* (**Figure 40f et 40g**). Ces marquages réalisés sur des coupes de souris WT m'ont permis de valider les mises au point techniques, et de définir le marquage attendu en conditions physiologiques sur nos animaux. Par la suite, nous marquerons des coupes de souris WT et *Hsf2 KO* avec ces sondes, pour caractériser les défauts liés à l'absence du facteur HSF2.

Pour compléter l'analyse de l'organisation des structures du cerveau et identifier les populations neuronales spécifiques possiblement impactées par l'absence de HSF2, j'ai entrepris de manière très préliminaire un comptage des neurones marqués par HIS avec ces marqueurs spécifiques sur des coupes de souris WT ou *Hsf2 KO*. Par cette méthode, nous souhaitons identifier si l'absence du facteur HSF2 affecte une population neuronale dans les régions dont la structure est désorganisée, et dont la densité des épines dendritiques est diminuée.

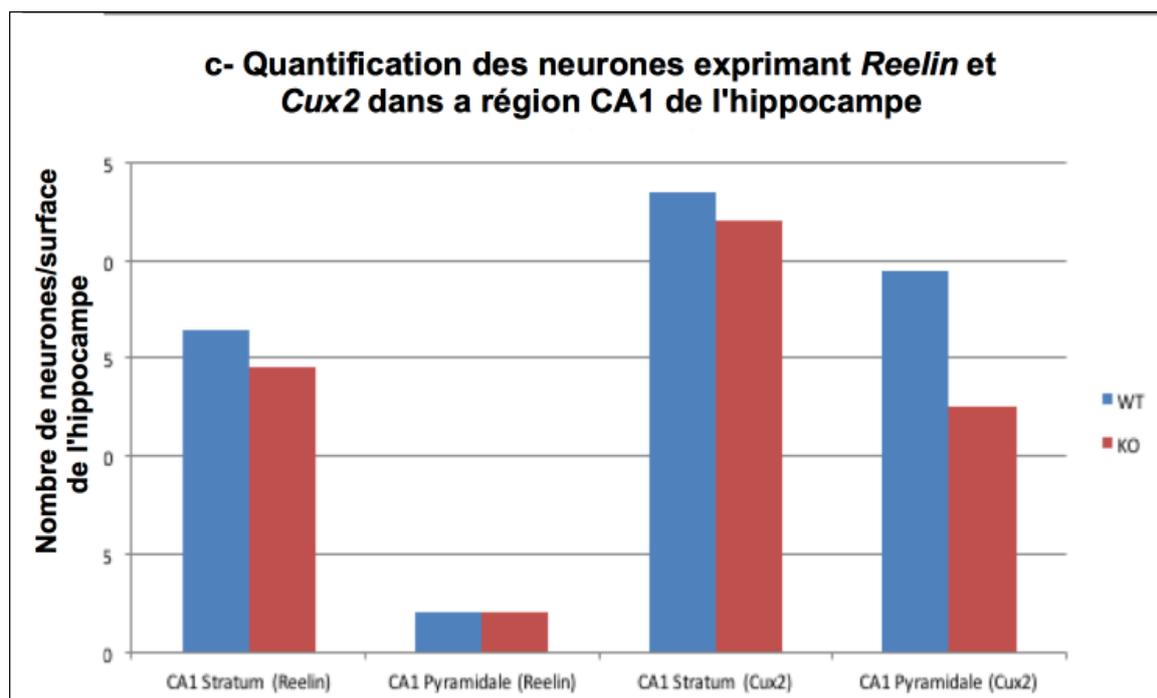
J'ai réalisé un premier comptage des neurones marqués avec la sonde *Reelin* sur l'ensemble du cortex préfrontal. J'ai compté également les neurones marqués par la sonde *Cux2* dans la couche III et qui projette dans la couche I du cortex, en relation avec la couche corticale d'intérêt pour l'analyse de la densité des épines dendritiques. Ces données très préliminaires suggèrent qu'il pourrait y avoir une augmentation de la population d'interneurones inhibiteurs chez les souris *Hsf2 KO* dans cette structure. Cette analyse permettra donc de préciser les défauts structuraux observés au niveau des couches corticales désorganisées (**Figure 41**).

Pour l'hippocampe, nous nous sommes particulièrement intéressés à la densité des épines dendritiques des neurones de la couche pyramidale dans la région CA1 et dans la couche stratum oriens (au-dessus de la couche pyramidale). Pour cette raison, j'ai analysé l'expression des marqueurs de ces couches. J'ai compté les neurones sur des coupes marquées soit avec la sonde *Reelin*, soit avec la sonde *Cux 2*, les deux sondes qui marquent



Hippocampe (H), marqué par la sonde ARN Reelin

Hippocampe (H), marqué par la sonde ARN Cux2



**Figure 42 – Hybridation in situ sur coupes de cerveau au niveau de l'hippocampe (H).**

*(a-b) Images de microscopie optique (observation X10) d'hybridation in situ (HIS) sur coupes coronales de cerveaux de souris mâles adultes C57Bl/6N sauvages de 120 jours. Barre d'échelle : 1mm coupe entière et 0,5mm panneau d'agrandissement. Les régions analysées sont délimitées par des marques rouges, montrant la méthodologie pour le comptage des neurones marqués dans la région d'intérêt de l'hippocampe, CA1 : neurones spécifiques inhibiteurs (GABAergiques) dans le cortex préfrontal par la sonde ARN Reelin (a) ; neurones spécifiques de la couche II/III du cortex au niveau préfrontal avec la sonde ARN Cux2 (b). Hippocampe (H), Couche Stratum oriens (STO), Couche Stratum radiatum (STR), Couche pyramidale (PY), Gyrus denté (DG).*

*(c) Quantification de la densité des neurones spécifiques inhibiteurs (GABAergiques) dans la région CA1 de l'hippocampe par la sonde ARN Reelin (à gauche) ; quantification de la densité des neurones spécifiques de la couche II/III du cortex au niveau préfrontal avec la sonde ARN Cux2 (à droite), chez les souris adultes WT (bleu, n=1) ou KO (rouge, n=1) pour Hsf2.*

l'hippocampe. Le résultat préliminaire montre une diminution neuronale chez les animaux mutants pour *Hsf2*, au niveau des hippocampes (**Figure 42**).

Ces analyses préliminaires n'ont, pour le moment, été réalisées que sur une seule souris WT et une seule souris *Hsf2 KO*, nous devons donc compléter les échantillons avec des animaux supplémentaires. Les analyses de la densité de neurones spécifiques sont néanmoins encourageantes. Elles révèlent qu'il pourrait y avoir une différence de la densité neuronale (soit réduite, soit augmentée), entre les animaux sauvages et les animaux mutants, au niveau de structures d'intérêt ayant des défauts chez les KO *Hsf2*.

## Conclusions et discussions

Les analyses histologiques que j'ai réalisées pendant mes travaux de recherche confirment d'une part les résultats attendus par les études précédentes et permettent d'autre part d'orienter les investigations futures pour la compréhension du phénotype comportemental des animaux adultes *Hsf2* KO. J'ai notamment validé une diminution de la surface des sections de cerveau, et identifié que ce défaut était principalement dû à un problème dans la région la plus antérieure du cerveau. Cependant, contrairement à ce qui pouvait être attendu, ce n'est pas la surface du cortex qui semble être touchée au niveau de ces coupes antérieures.

En revanche, ces expériences m'ont permis d'identifier clairement des défauts d'organisation des corps cellulaires dans les couches corticales, qui sont difficilement identifiables chez les souris *Hsf2* KO ; les couches 2/3, 4 et 5 semblent le plus perturbées : les couches 2/3 semblent plus fines et la couche 4 plus épaisse. Les couches 5 et 6 ne sont plus correctement délimitées. Également, certaines régions du diencephale, telles que le thalamus et l'hypothalamus, semblent déstructurées. J'ai pu relever, en particulier, qu'au niveau de l'hypothalamus, le noyau hypothalamique paraventriculaire (zone périventriculaire, PVZ) n'est plus observable en absence du facteur HSF2 (**Figure 35**).

La région du cortex cérébral sera analysée plus finement grâce à l'utilisation de marqueurs des couches corticales, visualisés par *HIS*. Pour cela, j'ai déjà mis au point cette technique sur le type de coupe que nous utilisons pour cette étude, et généré des sondes ARN pour le marquage spécifique de certains neurones, ou certaines couches corticales. J'ai commencé cette analyse sur une souris *KO* et une souris *WT*. Pour poursuivre ces marquages spécifiques de couches, de nouveaux échantillons devront être collectés. Au vu des résultats obtenus pour la région du thalamus qui a une surface réduite, il serait aussi intéressant de trouver un marqueur spécifique de cette structure pour confirmer cette observation.

Par ailleurs, mes analyses au niveau cellulaire montrent qu'il y a des défauts de densité synaptique dans les structures associées au système de récompense. Dans le cortex

préfrontal, et le striatum, la densité des épines est diminuée, alors que dans le noyau accumbens et l'hippocampe la diminution de densité observée n'est pas significative. Cela montre que certaines structures ont moins de synapses dans des circuits d'intérêts pour notre étude, et vraisemblablement qu'il y a des défauts associés de transmission synaptique.

Une partie de ces résultats reste encore à confirmer, pour augmenter la robustesse des analyses statistiques, mais ils montrent que HSF2 est important dans le cerveau adulte, dans son organisation générale, mais aussi sûrement d'un point de vue fonctionnel. L'origine de ces défauts est à chercher soit dans la mise en place des structures du cerveau, soit dans leur fonctionnement chez l'adulte puisque le facteur HSF2 y est présent dans les deux cas.

## Discussion générale

## Discussion générale

---

### ***Conditions expérimentales de ChIP-seq visant à identifier les cibles moléculaires des facteurs HSF2 et DNMT3A***

Notre équipe a montré que suite à une exposition prénatale à l'alcool, HSF2 conserve sa fixation avec DNMT3A. Nous avons émis une hypothèse de travail selon laquelle, trois situations sont possibles, en fonction du gène cible :

- Soit HSF2 recrute DNMT3A sur des cibles non physiologiques et induit une hyperméthylation locale de ces cibles, inhibant ainsi probablement l'expression des gènes ciblés
- Soit HSF2 séquestre DNMT3A à distance de la chromatine, empêchant DNMT3A de se fixer sur ses cibles habituelles induisant ainsi une hypométhylation de l'ADN de ces gènes, et participant ainsi probablement à leur activation transcriptionnelle.
- Soit le complexe HSF2/ DNMT3A, n'implique pas de modification du profil de méthylation des gènes cibles, ni de leur expression.

Les analyses préliminaires de la capture du méthylome, réalisées par Agathe Duchateau (étudiante en thèse) ont permis de mettre en évidence, parmi les cortex murins E16.5 ayant subi une exposition prénatale aiguë à l'alcool, 41 régions hypométhylées (dont *Mid1* identifié comme une cible de HSF2) et 41 régions hyperméthylées, par rapport aux animaux contrôles.

Les expériences de *ChIP-Seq* à venir, et pour lesquelles j'ai participé à l'optimisation du protocole, permettront donc de croiser les données du profil de méthylation avec les cibles de HSF2 et de DNMT3A qui seront identifiées. Ces analyses visent à comprendre les mécanismes de régulations transcriptionnelles induites par le facteur HSF2 en réponse au stress alcoolique, et notamment à identifier si tout, ou une partie de cette réponse au stress alcoolique passe par une régulation de la méthylation du génome.

Les expériences de CHIP que nous sommes en train de réaliser, se font sur plusieurs échantillons :

- Des embryons sauvages dont la mère a subi des injections de PBS
- Des embryons mutants pour *Hsf2* dont la mère a subi des injections de PBS
- Des embryons sauvages dont la mère a subi des injections d'éthanol
- Des embryons mutants pour *Hsf2* dont la mère a subi des injections d'éthanol.

Pour chaque type d'échantillon (muté ou non, stressé ou non), deux expériences d'immunoprécipitations auront lieu (l'une avec un anticorps ciblant HSF2, l'autre avec un anticorps ciblant DNMT3A).

Les ADN immunoprécipités seront séquencés, ainsi que les ADN isolés à partir des échantillons initiaux avant immunoprécipitation (ADN « INPUT »).

Les données de séquençage seront ensuite alignées sur le génome murin de référence (mm9).

Plusieurs analyses pourront alors être réalisées :

1. Chaque donnée de *ChIP-seq* sera comparée aux données de l'INPUT correspondant :

Une telle comparaison permettra d'identifier les séquences enrichies après immunoprécipitation par rapport à l'INPUT, indiquant dans un contexte donné **les sites de fixation du facteur étudié** (HSF2 et/ou DNMT3A).

2. Pour une condition donnée (pour un même échantillon), les données de *ChIP-seq* ciblant HSF2 seront comparées à celles ciblant DNMT3A :

Une telle comparaison permettra d'identifier les **séquences communes** ou non de **fixation des facteurs** HSF2 et DNMT3A. Si de telles séquences existent, il sera alors possible d'identifier une séquence consensus de co-fixation de HSF2 et de DNMT3A.

3. Pour une condition de stress donnée, il sera possible de comparer les données de *ChIP-seq* ciblant HSF2 ou DNMT3A dans des contextes génétiques différents (sauvage ou mutant pour HSF2) :

Une telle comparaison permettra de valider pour HSF2, les sites potentiels de fixation identifiés lors de la comparaison avec l'INPUT : la spécificité des sites étant ainsi vérifiée. D'autre part, si les cibles de DNMT3A sont différentes selon le génotype mutant ou sauvage vis-à-vis de HSF2, alors cela indiquera que HSF2 module la fixation de DNMT3A sur ses cibles.

4. Enfin, dans des contextes génétiques donnés (WT ou mutant pour *Hsf2*), il sera possible de comparer les données de *ChIP-seq* ciblant HSF2 ou DNMT3A dans des contextes de stress différents (PBS ou Ethanol) :

Une telle comparaison permettra, de caractériser, à l'échelle du génome, les modifications de fixation de HSF2 et de DNMT3A en fonction du stress et, de définir si la modulation de leur fixation présente des caractéristiques communes.

Enfin, à partir de l'identification de différentes régions d'intérêt, sur la base de l'étude du méthylome par Agathe Duchateau, il sera possible de définir l'état de méthylation de ces sites identifiés en fonction du stress. Le profil de méthylation de ces sites est ensuite validé par des expériences de pyroséquençage. L'ensemble de ces données permettra d'élaborer un modèle moléculaire impliquant ou non DNMT3A et/ou HSF2 en fonction du stress, expliquant les modifications du profil de méthylation observées à l'issue d'un stress alcoolique.

Afin de vérifier si l'expression de gènes cibles de HSF2 et DNMT3A ainsi identifiés est modulée en fonction du génotype (WT ou *Hsf2*<sup>-/-</sup>), nous pourrions réaliser des *HIS* sur des cortex issus d'animaux sauvages et mutants pour HSF2, ciblant les ARN de ces gènes. Nous pourrions réaliser ces marquages d'abord à E16,5 pour corréler ces analyses au modèle murin utilisé pour les *ChIP-Seq*, mais aussi à différents stades embryonnaires, ou chez l'adulte (ayant subi une EPA) pour mettre en évidence d'éventuels changements de profil d'expression induits par l'alcoolisation foétale.

De telles analyses seront aussi réalisées sur des animaux *Dnmt3a*<sup>-/-</sup>, afin de vérifier l'implication de DNMT3A dans les profils observés au niveau des gènes cibles identifiés. On vérifiera notamment le profil d'expression du gène *Hsf2* par *HIS*, en absence de *Dnmt3a*, chez l'embryon et chez l'adulte, dans un contexte ou non de stress alcoolique. Et, on étudiera par *ChIP-QPCR*, si dans de tels contextes, HSF2 se maintient au niveau de gènes cibles identifiés.

### ***Défauts morphologiques du cerveau en absence du facteur HSF2 : origine développementale ou altérations chez l'adulte ?***

La diminution de la taille de la surface des sections de cerveau des souris adultes KO *Hsf2* suggère qu'il y a un volume tissulaire réduit dans le cerveau chez ces souris par rapport au WT. L'origine de cette diminution pourrait être :

1. Une dégradation des neurones, ou des cellules gliales due à une dégénérescence des cellules ou une perte de matière (neurites, myéline) au cours de la vie de l'animal.
2. Un défaut précoce de mise en place des structures du cerveau, par exemple due à un défaut de prolifération, ou un défaut de différenciation de neurones ou de cellules gliales au cours du développement. Nous pourrions aussi envisager que les arbres dendritiques pourraient être moins complexes, et aboutir à moins de "matière" dans ces structures.

L'une des pistes à investiguer pour tester une dégradation des neurones, serait de déterminer si ces neurones subissent un phénomène d'apoptose. Le processus d'apoptose, ou mort cellulaire programmée est, en effet, l'un des mécanismes qui intervient fréquemment dans les maladies neurodégénératives, et qui s'en trouve déséquilibré (Valenzuela et al. 2012; Mattson 2000; Tatton et Olanow 1999). Il serait possible de mettre en évidence ces mécanismes par des immunofluorescences sur des coupes de souris adultes, visant à marquer les caspases activées (caspase-3 active), les protéases qui s'activent quand l'apoptose devient irréversible, et qui marquent ce processus.

D'autre part, HSF2 étant impliqué très tôt au cours du développement pendant la période de neurogenèse, il n'est pas exclu que la diminution des neurones chez les souris KO *Hsf2*, soit le résultat de défauts de prolifération ou de différenciation qui surviennent au cours du développement embryonnaire. Ces défauts pourraient également conduire à activer les processus d'apoptoses de façon précoce. Cette piste est d'autant plus pertinente que nous avons déjà pu observer des cellules en apoptose dans la zone sous-ventriculaire de cerveau embryonnaire de souris *Hsf2* KO. Un comptage de ces cellules en apoptose, entre les souris mutantes et les sauvages permettrait de révéler si un tel processus existe.

Pour mettre en évidence des problèmes de neurogenèse, nous pourrions également quantifier les neurones sur des marquages histologiques, à différents stades de la neurogenèse et jusqu'aux stades adultes, en réalisant par exemple des immunohistochimie avec un anticorps anti-NeuN, une protéine neuronale nucléaire (Gusel'nikova et Korzhevskiy 2015; Mullen, Buck, et Smith 1992). Ces expériences permettraient de définir s'il existe un stade au cours de la neurogenèse à partir duquel survient une différence de prolifération neuronale entre les souris *KO* et les souris *WT*, et si cela se maintient jusque chez l'adulte.

Les désorganisations structurelles observées dans certaines sections et qui concernent le thalamus, ou l'hypothalamus, pourraient également résulter d'un déficit de neurones. Pour identifier précisément cette origine, il faudrait pouvoir suivre un marqueur neuronal de cette région. Dans l'équipe, nous avons mis en évidence, au cours du développement, des défauts de migration neuronale chez les souris *KO Hsf2* (Chang et al. 2006) qui pourrait expliquer l'observation combinée d'une déstructuration des couches corticales et d'une surface de cerveau inchangée par rapport au sauvage.

J'ai pu analyser les structures neuronales dans certaines régions du cerveau et montrer une diminution des épines dendritiques en absence du facteur HSF2. L'origine de la diminution de la densité des épines dendritiques, reste encore à déterminer. Il est possible qu'elle provienne d'un problème de croissance des épines et/ou d'une maturation incomplète pendant le développement, ou chez la jeune souris adulte. Cette défaillance conduirait alors à une formation anormale des épines dendritiques, et un nombre inférieur à ce qui est attendu. Il est possible que la longueur des épines soit aussi altérée. C'est un paramètre que nous n'avons pas encore mesuré, mais qui, nous donnerait des indications sur la maturation des épines. Une autre hypothèse est que la formation des épines se soit produite normalement mais qu'il y a une perte progressive des épines, donc des synapses, chez ces animaux, qui pourrait refléter un problème de neurotransmission. Une analyse temporelle de ce défaut sera nécessaire pour répondre à cette question

### **Significativité et variabilité des résultats expérimentaux**

Contrairement à ce qui aurait pu être attendu par rapport à nos précédentes observations, les mesures des structures du cerveau sur la série d'animaux analysée n'ont pas permis d'infirmer ou de valider statistiquement une réduction de la taille de l'hippocampe, ou encore de celle du cortex en absence de HSF2. En revanche, il a été possible de montrer que la région du thalamus, est significativement plus petite chez les souris KO *Hsf2* ( $p.value=0,01$ ). Ceci pourrait évoquer une régionalisation de la fonction du facteur HSF2, qui semble être plus marquée dans les régions antérieures du cerveau.

Cependant, l'ensemble des mesures montre tout de même une tendance allant dans le même sens pour toutes les structures : elles sont plus petites chez les souris KO *Hsf2*. Il est possible que les défauts observés soient trop peu prononcés pour pouvoir être mis en évidence de façon statistique sur un petit échantillon. Il nous faudrait donc augmenter le nombre de souris pour confirmer ou non ces tendances. Cependant, la difficulté de produire des souris KO, rend difficile l'obtention d'échantillons. En particulier, pour cette étude, nous avons travaillé uniquement sur des animaux mâles, dont la fréquence attendue est donc de 1/8<sup>ème</sup> des individus d'une portée.

Nos observations confirment les observations de pénétrance incomplète et de grande variabilité du phénotype des souris KO *Hsf2* présentées dans l'analyse précédente de l'équipe (Chang et al. 2006). Les études chez l'adulte notamment se concentrent souvent chez les mâles pour éliminer la variabilité hormonale qu'il y a chez les femelles, surtout quand il s'agit d'études comportementales. C'est pour une question d'homogénéité des résultats, que nous avons débuté ces analyses chez le mâle, mais il se peut que les phénotypes que nous obtenons soient moins marqués chez les mâles que chez les femelles, comme le suggèrent les analyses comportementales, et électrophysiologiques, réalisées par nos collaborateurs (équipe de M. Naassila à Amiens). Leurs travaux sur le comportement suggèrent, en effet, que le phénotype de ces animaux est plus marqué chez les femelles.

Nos données collectées proviennent de deux séries d'animaux, qui, prises indépendamment, donnent des résultats différents de l'analyse groupée, cette divergence nous interroge. HSF2 est un facteur impliqué dans la réponse au stress, il est donc possible que ces animaux soient plus sensibles au stress. Bien que les pratiques animalières soient

très contrôlées, il n'est pas possible d'éliminer toutes les sources de stress liées, notamment, à la manipulation. Les conditions des souris en animalerie, et leurs manipulations les exposent à des stress auxquels elles répondent individuellement différemment, et probablement de façon plus variable en absence de HSF2 pour tamponner cet effet. Il est donc difficile de normaliser ce stress et cela pourrait provoquer une variabilité que nous ne maîtrisons pas chez nos animaux.

Enfin, il est possible de se questionner sur le fond génétique utilisé pour notre étude. Il est décrit dans la littérature que les souris de fond génétique C57BL/6J diffèrent des souris C57BL/6N dans la réponse à la peur et à l'alcool, ce qui peut avoir une incidence sur le paramètre de stress du groupe contrôle de souris WT, nos souris étant des souris C57BL/6N.

### ***Particularité du fond génétique C57BL/6N***

Il a été décrit que le comportement des souris C57BL/6N diffère de celui des souris C57BL/6J, plus souvent utilisées dans les études comportementales. Les souris C57BL/6J préfèrent s'immobiliser, et ont une locomotion particulièrement réduite en réponse à la peur (Radulovic, Kammermeier, et Spiess 1998; Stiedl et al. 1999). Il est donc indispensable de prendre en compte cette réponse comportementale, dans nos résultats puisque la réponse à la peur, et la réponse au stress sont en lien. Suvrathan et coll. rapportent que le stress augmente la peur en favorisant la réponse synaptique, en entraînant des modifications électrophysiologiques et morphologiques (Suvrathan et al. 2014; Johnson 2016).

Les expérimentations électrophysiologiques et comportementales réalisées par nos collaborateurs avec cette lignée de souris, semblent confirmer que les souris WT mâles donnent des résultats plus variables que les souris femelles. Nous avons également pu observer que les souris femelles ont des défauts plus prononcés que les souris mâles dans ce fond génétique. Pour poursuivre nos analyses, nous souhaitons faire avec les femelles les mêmes analyses morphologiques que nous avons faites sur des animaux mâles et continuer les analyses comportementales avec des souris femelles.

Par ailleurs, après une alcoolisation aiguë des animaux WT et KO *Hsf2*, nos collaborateurs observent, comme attendu, d'abord une augmentation transitoire de l'activité locomotrice puis une diminution de cette activité au cours du temps. Cependant, cette hyper-activité locomotrice initiale est plus marquée chez les souris KO *Hsf2* par rapport aux souris contrôles. Ceci renforce l'idée que le facteur HSF2 contribuerait à une action protectrice chez l'adulte en situation de stress alcoolique.

***L'absence de HSF2 est responsable de la diminution de la densité des épines dendritiques et perturbe le fonctionnement neuronal***

L'altération morphologique des dendrites, observée chez les souris KO *Hsf2*, pourrait entraîner leurs dysfonctionnements (déformation structurale, défauts des récepteurs membranaires, etc...). Nous pouvons nous demander si les défauts morphologiques des dendrites, chez les souris KO *Hsf2*, sont à l'origine des défauts de la LTD au niveau de l'hippocampe.

Nos collaborateurs ont montré, par des analyses de voltamétrie cyclique, un défaut de relargage de la dopamine au niveau de la coquille du noyau accumbens chez les souris KO *Hsf2*. Ceci pourrait mettre en cause la densité des épines dendritiques, qui permettent les connexions synaptiques. D'une façon plus générale, la diminution de la densité des épines pourrait défavoriser les transmissions synaptiques et entraîner de nombreux défauts fonctionnels.

S'il est avéré que ces défauts empêchent une bonne transmission synaptique, ces résultats évoqueraient alors des perturbations dans les circuits qui impliquent ces structures, tels que le système de récompense dopaminergique, lié à l'addiction. Nos collaborateurs ont d'ailleurs déjà pu mettre en évidence des différences de sensibilisation à l'alcool et aux amphétamines chez les souris KO *Hsf2*.

Bien qu'il soit intéressant de soulever le lien éventuel entre la perte de densité des épines dendritiques et les défauts fonctionnels observés au niveau de l'hippocampe et de la coquille du noyau accumbens, les résultats montrent que la diminution de la densité des épines pour ces deux structures n'est qu'une tendance. Seules les densités des épines

dendritiques du striatum et du cortex sont significativement réduites chez les souris KO *Hsf2* par rapport aux WT.

Nous ne pouvons pas négliger la marge d'erreur induite par les aspects techniques de l'expérience. Comme précisé précédemment, il semble, en effet, qu'il y ait une différence entre les deux séries d'animaux analysées. En dehors de possibles différences déjà évoquées dans des conditions d'expositions au stress, les deux séries d'animaux n'ont pas exactement été marquées de la même façon. En effet, il y a eu un changement de technique entre les deux séries : les dépôts des cristaux ont d'abord été réalisés manuellement puis grâce au *gene gun*. Nous avons pu observer que la diffusion des cristaux de DiI donnait un marquage plus ou moins net selon les coupes, et permettait d'obtenir des images de qualités assez différentes, et parfois difficiles à analyser. Ceci laisse penser que la technique de marquage au DiI ne permet pas un marquage homogène entre les coupes, et que chaque étape de l'expérience est extrêmement critique pour l'analyse des échantillons (coupe, fixation, et marquage des tissus, acquisition d'images, quantification, etc...).

La précision des régions ciblées ajoute aussi une marge d'imprécision et de variabilité pour la collecte des données. En effet, dans la technique de DiI, un marquage aléatoire est réalisé, en fonction des endroits que les cristaux vont atteindre. Pour l'hippocampe, nous visions la région CA1, et pour la structure du noyau accumbens nous visions la région de la coquille (ou Shell). Cette restriction ne laisse qu'une petite étendue de chaque structure pour pouvoir trouver des neurones marqués. Très peu de neurones sont marqués et il est parfois difficile de déterminer avec confiance si les dendrites choisies appartiennent strictement aux structures d'intérêts. Un co-marquage spécifique de ces régions aurait permis de localiser précisément les neurones choisis pour l'analyse, ce qui n'a pas été possible de réaliser.

### ***La perte d'expression du facteur HSF2 est-elle impliquée dans des neuropathologies ?***

De nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques sont liées à des défauts d'épines dendritiques. Bien que le laboratoire ait montré d'une part, que l'absence du facteur HSF2 induise des défauts de migration neuronale pendant le développement, et que d'autre part, HSF2 soit responsable de troubles neurologiques en étant activé en réponse au stress alcoolique foetal, aucune donnée ne met directement en cause l'absence de HSF2 dans des troubles neurologiques ou psychiatriques en dehors des mécanismes de réponse au stress. Les analyses que j'ai menées ont mis en évidence la diminution des épines dendritiques en l'absence de HSF2. Ce phénotype, soulève la question de la potentielle implication de HSF2 dans certains troubles neurologiques. L'hypodensité des épines pourrait altérer de nombreuses fonctions du cerveau, notamment les aptitudes d'apprentissages liées au cortex, ou encore jouer un rôle dans les mécanismes d'addiction dont dépendent le striatum et l'accumbens dans le circuit de la récompense.

Notre équipe a récemment identifié une diminution de niveau de HSF2 dans le syndrome de Rubinstein-Taybi (SRT), une maladie rare d'origine génétique qui cause des retards mentaux (A. de Thonel, V. Mezger, données non publiées). Les mutations qui causent le SRT touchent les facteurs CBP et P300, qui semblent être des régulateurs post-traductionnels de HSF2.

### ***Conclusion***

Les analyses morphologiques que j'ai réalisées montrent déjà qu'en absence de HSF2 l'organisation des couches corticales est affectée, et que la surface du cerveau est réduite de façon régionalisée. Ces analyses montrent que ces défauts sont marqués dans la région antérieure du cerveau, probablement dus en partie à la surface du thalamus qui est réduite.

Nous savons, par ailleurs, que presque l'ensemble du cortex cérébral reçoit des projections thalamiques, et que, en réponse, le cortex envoie des fibres descendantes vers le thalamus. Ces échanges cortico-thalamiques constituent un système de contrôle et de régulation des fonctions du cerveau, et pourrait être affectés chez les souris *Hsf2* KO. Si ces hypothèses se vérifient, elles s'ajoutent à la diminution de la densité des épines

dendritiques que j'ai pu montrer dans le cortex et le striatum suggérant des défauts de transmissions synaptiques. Ces hypothèses sont appuyées par les défauts électrophysiologiques et voltamétriques mis en évidence par nos collaborateurs, ainsi que les troubles comportementaux liés aux circuits de la récompense.



## Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

- Abane, Ryma, et Valérie Mezger. 2010. « Roles of Heat Shock Factors in Gametogenesis and Development ». *The FEBS Journal* 277 (20): 4150-72.
- Alastalo, T. P., M. Lönnström, S. Leppä, K. Kaarniranta, M. Peltö-Huikko, L. Sistonen, et M. Parvinen. 1998. « Stage-Specific Expression and Cellular Localization of the Heat Shock Factor 2 Isoforms in the Rat Seminiferous Epithelium ». *Experimental Cell Research* 240 (1): 16-27. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3926>.
- Anderson, S. A., O. Marín, C. Horn, K. Jennings, et J. L. Rubenstein. 2001. « Distinct Cortical Migrations from the Medial and Lateral Ganglionic Eminences ». *Development (Cambridge, England)* 128 (3): 353-63.
- Avilion, Ariel A., Silvia K. Nicolis, Larysa H. Pevny, Lidia Perez, Nigel Vivian, et Robin Lovell-Badge. 2003. « Multipotent Cell Lineages in Early Mouse Development Depend on SOX2 Function ». *Genes & Development* 17 (1): 126-40. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>.
- Bahar Halpern, Keren, Tal Vana, et Michael D. Walker. 2014. « Paradoxical Role of DNA Methylation in Activation of FoxA2 Gene Expression during Endoderm Development ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (34): 23882-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573469>.
- Bannister, Andrew J, et Tony Kouzarides. 2011. « Regulation of chromatin by histone modifications ». *Cell Research* 21 (3): 381-95. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- Beddington, Rosa S. P, et Elizabeth J Robertson. 1999. « Axis Development and Early Asymmetry in Mammals ». *Cell* 96 (2): 195-209. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80560-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80560-7).
- Bernal, Autumn J., et Randy L. Jirtle. 2010. « Epigenomic Disruption: The Effects of Early Developmental Exposures ». *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology* 88 (10): 938-44. <https://doi.org/10.1002/bdra.20685>.
- Bielle, Franck, Amélie Griveau, Nicolas Narboux-Nême, Sébastien Vigneau, Markus Sigrist, Silvia Arber, Marion Wassef, et Alessandra Pierani. 2005. « Multiple Origins of Cajal-Retzius Cells at the Borders of the Developing Pallium ». *Nature Neuroscience* 8 (8): 1002-12. <https://doi.org/10.1038/nn1511>.
- Boone, Adrienne N., et Mathilakath M. Vijayan. 2002. « Constitutive Heat Shock Protein 70 (HSC70) Expression in Rainbow Trout Hepatocytes: Effect of Heat Shock and Heavy Metal Exposure ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP* 132 (2): 223-33.
- Bronson, Stefanie L., et Tracy L. Bale. 2016. « The Placenta as a Mediator of Stress Effects on Neurodevelopmental Reprogramming ». *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 41 (1): 207-18. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.231>.
- Camarini, R., et R. M. Pautassi. 2016. « Behavioral Sensitization to Ethanol: Neural Basis and Factors That Influence Its Acquisition and Expression. » *Brain Research Bulletin* 125 (juillet): 53-78. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.04.006>.

- Chang, Yunhua, Päivi Ostling, Malin Akerfelt, Diane Trouillet, Murielle Rallu, Yorick Gitton, Rachid El Fatimy, et al. 2006. « Role of Heat-Shock Factor 2 in Cerebral Cortex Formation and as a Regulator of P35 Expression ». *Genes & Development* 20 (7): 836-47. <https://doi.org/10.1101/gad.366906>.
- Chen, Bi-Feng, et Wai-Yee Chan. 2014. « The de novo DNA methyltransferase DNMT3A in development and cancer ». *Epigenetics* 9 (5): 669-77. <https://doi.org/10.4161/epi.28324>.
- Chiang, P. K., R. K. Gordon, J. Tal, G. C. Zeng, B. P. Doctor, K. Pardhasaradhi, et P. P. McCann. 1996. « S-Adenosylmethionine and Methylation ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10 (4): 471-80.
- Christians, E., E. Michel, P. Adenot, V. Mezger, M. Rallu, M. Morange, et J. P. Renard. 1997. « Evidence for the Involvement of Mouse Heat Shock Factor 1 in the Atypical Expression of the HSP70.1 Heat Shock Gene during Mouse Zygotic Genome Activation ». *Molecular and Cellular Biology* 17 (2): 778-88.
- Clarke, Margaret E., et W. Benton Gibbard. 2003. « Overview of Fetal Alcohol Spectrum Disorders for Mental Health Professionals ». *The Canadian Child and Adolescent Psychiatry Review = La Revue Canadienne De Psychiatrie De L'enfant Et De L'adolescent* 12 (3): 57-63.
- Clos, J., J. T. Westwood, P. B. Becker, S. Wilson, K. Lambert, et C. Wu. 1990. « Molecular Cloning and Expression of a Hexameric Drosophila Heat Shock Factor Subject to Negative Regulation ». *Cell* 63 (5): 1085-97.
- Copp, Andrew J., Nicholas D. E. Greene, et Jennifer N. Murdoch. 2003. « The Genetic Basis of Mammalian Neurulation ». *Nature Reviews Genetics* 4 (10): 784-93. <https://doi.org/10.1038/nrg1181>.
- Coune, F., B. Silvestre de Ferron, M. C. González-Marín, J. Antol, M. Naassila, et O. Pierrefiche. 2017. « Resistance to Ethanol Sensitization Is Associated with a Loss of Synaptic Plasticity in the Hippocampus ». *Synapse (New York, N.Y.)* 71 (2). <https://doi.org/10.1002/syn.21899>.
- Cruz, Fabio C., Klil R. Babin, Rodrigo M. Leao, Evan M. Goldart, Jennifer M. Bossert, Yavin Shaham, et Bruce T. Hope. 2014. « Role of Nucleus Accumbens Shell Neuronal Ensembles in Context-Induced Reinstatement of Cocaine-Seeking ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (22): 7437-46. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0238-14.2014>.
- Ehrlich, Melanie. 2003. « The ICF Syndrome, a DNA Methyltransferase 3B Deficiency and Immunodeficiency Disease ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 109 (1): 17-28.
- Ehrlich, Melanie, Cecilia Sanchez, Chunbo Shao, Rie Nishiyama, John Kehrl, Rork Kuick, Takeo Kubota, et Samir M. Hanash. 2008. « ICF, An Immunodeficiency Syndrome: DNA Methyltransferase 3B Involvement, Chromosome Anomalies, and Gene Dysregulation ». *Autoimmunity* 41 (4): 253-71. <https://doi.org/10.1080/08916930802024202>.
- El Fatimy, Rachid, Federico Miozzo, Anne Le Mouël, Ryma Abane, Leslie Schwendimann, Délara Sabéran-Djoneidi, Aurélie de Thonel, et al. 2014. « Heat shock factor 2 is a stress-responsive mediator of neuronal migration defects in models of fetal alcohol syndrome ». *EMBO Molecular Medicine* 6 (8): 1043-61. <https://doi.org/10.15252/emmm.201303311>.
- Eugene Hoyne, H., Philip A. May, Wendy O. Kalberg, Piyadasa Kodituwakku, J. Phillip Gossage, Phyllis M. Trujillo, David G. Buckley, et al. 2005. « A Practical Clinical Approach to Diagnosis of Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Clarification of the

- 1996 Institute of Medicine Criteria». *Pediatrics* 115 (1): 39-47. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-0259>.
- Feng, Jian, Hua Chang, En Li, et Guoping Fan. 2005. « Dynamic Expression of de Novo DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the Central Nervous System ». *Journal of Neuroscience Research* 79 (6): 734-46. <https://doi.org/10.1002/jnr.20404>.
- Frantz, G. D., J. M. Weimann, M. E. Levin, et S. K. McConnell. 1994. « Otx1 and Otx2 Define Layers and Regions in Developing Cerebral Cortex and Cerebellum ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14 (10): 5725-40.
- Fujimoto, Mitsuaki, Naoki Hayashida, Takuma Katoh, Kouji Oshima, Toyohide Shinkawa, Ramachandran Prakasam, Ke Tan, Sachiye Inouye, Ryosuke Takii, et Akira Nakai. 2010. « A Novel Mouse HSF3 Has the Potential to Activate Nonclassical Heat-Shock Genes during Heat Shock ». *Molecular Biology of the Cell* 21 (1): 106-16. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-07-0639>.
- Gallais, André, et Agnès Ricoch. 2006. *Plantes transgéniques : faits et enjeux*. Editions Quae.
- Gardner, R. L. 2001. « Specification of Embryonic Axes Begins before Cleavage in Normal Mouse Development ». *Development (Cambridge, England)* 128 (6): 839-47.
- Gilbert, Scott F. 2000. « Early Mammalian Development ». *Developmental Biology*. 6th Edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10052/>.
- Gilmore, Edward C., et Karl Herrup. 1997. « Cortical development: Layers of complexity ». *Current Biology* 7 (4): R231-34. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00108-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00108-4).
- Gopalakrishnan, Suhasni, Beth A. Sullivan, Stefania Trazzi, Giuliano Della Valle, et Keith D. Robertson. 2009. « DNMT3B interacts with constitutive centromere protein CENP-C to modulate DNA methylation and the histone code at centromeric regions ». *Human Molecular Genetics* 18 (17): 3178-93. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp256>.
- Gressens, P., B. Mesples, N. Sahir, S. Marret, et A. Sola. 2001. « Environmental Factors and Disturbances of Brain Development ». *Seminars in Neonatology: SN* 6 (2): 185-94. <https://doi.org/10.1053/siny.2001.0048>.
- Gusel'nikova, V. V., et D. E. Korzhevskiy. 2015. « NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker ». *Acta Naturae* 7 (2): 42-47.
- Hsieh, Chih-Lin. 1999. « In Vivo Activity of Murine De Novo Methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8211-18.
- Ito, Rutsuko, et Anja Hayen. 2011. « Opposing Roles of Nucleus Accumbens Core and Shell Dopamine in the Modulation of Limbic Information Processing ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (16): 6001-7. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6588-10.2011>.
- Jedrusik, Agnieszka, David-Emlyn Parfitt, Guoji Guo, Maria Skamagki, Joanna B. Grabarek, Martin H. Johnson, Paul Robson, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2008. « Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo ». *Genes & Development* 22 (19): 2692-2706. <https://doi.org/10.1101/gad.486108>.
- Jin, Xiongjie, Binnur Eroglu, Demetrius Moskophidis, et Nahid F. Mivechi. 2011. « Targeted Deletion of Hsf1, 2, and 4 Genes in Mice ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 787: 1-20. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-295-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-295-3_1).
- Johnson, Luke R. 2016. « Editorial: How Fear and Stress Shape the Mind ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10 (mars). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00024>.

- Jones, Kenneth L., et David W. Smith. 1973. « RECOGNITION OF THE FETAL ALCOHOL SYNDROME IN EARLY INFANCY ». *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 7836, 302 (7836): 999-1001. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(73\)91092-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(73)91092-1).
- Kalivas, P. W., et J. Stewart. 1991. « Dopamine Transmission in the Initiation and Expression of Drug- and Stress-Induced Sensitization of Motor Activity ». *Brain Research. Brain Research Reviews* 16 (3): 223-44.
- Kallio, Marko, Yunhua Chang, Martine Manuel, Tero-Pekka Alastalo, Murielle Rallu, Yorick Gitton, Lila Pirkkala, et al. 2002a. « Brain Abnormalities, Defective Meiotic Chromosome Synapsis and Female Subfertility in HSF2 Null Mice ». *The EMBO Journal* 21 (11): 2591-2601. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2591>.
- . 2002b. « Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice ». *The EMBO Journal* 21 (11): 2591-2601. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2591>.
- Kaminen-Ahola, Nina, Arttu Ahola, Murat Maga, Kylie-Ann Mallitt, Paul Fahey, Timothy C. Cox, Emma Whitelaw, et Suyinn Chong. 2010. « Maternal Ethanol Consumption Alters the Epigenotype and the Phenotype of Offspring in a Mouse Model ». *PLoS Genetics* 6 (1): e1000811. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000811>.
- Kantengwa, S, et B S Polla. 1993. « Phagocytosis of Staphylococcus aureus induces a selective stress response in human monocytes-macrophages (M phi): modulation by M phi differentiation and by iron. » *Infection and Immunity* 61 (4): 1281-87.
- Kim, Jinmee, Myung Chan Gye, et Moon Kyoo Kim. 2004. « Role of Occludin, a Tight Junction Protein, in Blastocoel Formation, and in the Paracellular Permeability and Differentiation of Trophectoderm in Preimplantation Mouse Embryos ». *Molecules and Cells* 17 (2): 248-54.
- Kleiber, Morgan L., Eric J. Diehl, Benjamin I. Laufer, Katarzyna Mantha, Aniruddho Chokroborty-Hoque, Bonnie Alberry, et Shiva M. Singh. 2014. « Long-term genomic and epigenomic dysregulation as a consequence of prenatal alcohol exposure: a model for fetal alcohol spectrum disorders ». *Frontiers in Genetics* 5 (juin). <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00161>.
- Koizumi, Shinji, Kaoru Suzuki, et Sachiko Yamaguchi. 2013. « Heavy Metal Response of the Heat Shock Protein 70 Gene Is Mediated by Duplicated Heat Shock Elements and Heat Shock Factor 1 ». *Gene* 522 (2): 184-91. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.090>.
- Laufer, Benjamin I., Katarzyna Mantha, Morgan L. Kleiber, Eric J. Diehl, Sean M. F. Addison, et Shiva M. Singh. 2013. « Long-lasting alterations to DNA methylation and ncRNAs could underlie the effects of fetal alcohol exposure in mice ». *Disease Models & Mechanisms* 6 (4): 977-92. <https://doi.org/10.1242/dmm.010975>.
- Lim, C. Y., B. B. Knowles, D. Solter, et D. M. Messerschmidt. 2016. « Chapter Nine - Epigenetic Control of Early Mouse Development ». In *Current Topics in Developmental Biology*, édité par Melvin L. DePamphilis, 120:311-60. Mammalian Preimplantation Development. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.05.002>.
- Liu, Phillip C. C., et Dennis J. Thiele. 1999. « Modulation of Human Heat Shock Factor Trimerization by the Linker Domain ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (24): 17219-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17219>.
- Liu, X. D., et D. J. Thiele. 1996. « Oxidative Stress Induced Heat Shock Factor Phosphorylation and HSF-Dependent Activation of Yeast Metallothionein Gene Transcription ». *Genes & Development* 10 (5): 592-603.

- Marin-Padilla, Miguel. 1978. « Dual Origin of the Mammalian Neocortex and Evolution of the Cortical Plate ». *Anatomy and Embryology* 152 (2): 109-26. <https://doi.org/10.1007/BF00315920>.
- Marjonen, Heidi, Alejandra Sierra, Anna Nyman, Vladimir Rogojin, Olli Gröhn, Anni-Maija Linden, Sampsa Hautaniemi, et Nina Kaminen-Ahola. 2015. « Early Maternal Alcohol Consumption Alters Hippocampal DNA Methylation, Gene Expression and Volume in a Mouse Model ». *PloS One* 10 (5): e0124931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124931>.
- Mattson, M. P. 2000. « Apoptosis in Neurodegenerative Disorders ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (2): 120-29. <https://doi.org/10.1038/35040009>.
- McGrath, J., et D. Solter. 1984. « Completion of Mouse Embryogenesis Requires Both the Maternal and Paternal Genomes ». *Cell* 37 (1): 179-83.
- Mezger, V., M. Rallu, R. I. Morimoto, M. Morange, et J. P. Renard. 1994. « Heat Shock Factor 2-like Activity in Mouse Blastocysts ». *Developmental Biology* 166 (2): 819-22. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1361>.
- Molyneaux, Bradley J., Paola Arlotta, Joao R. L. Menezes, et Jeffrey D. Macklis. 2007. « Neuronal Subtype Specification in the Cerebral Cortex ». *Nature Reviews Neuroscience* 8 (6): 427-37. <https://doi.org/10.1038/nrn2151>.
- Morimoto, R. I. 1993. « Cells in Stress: Transcriptional Activation of Heat Shock Genes ». *Science* 259 (5100): 1409-10. <https://doi.org/10.1126/science.8451637>.
- Morrison, A. J., S. J. Rush, et I. R. Brown. 2000. « Heat Shock Transcription Factors and the Hsp70 Induction Response in Brain and Kidney of the Hyperthermic Rat during Postnatal Development ». *Journal of Neurochemistry* 75 (1): 363-72.
- Motosugi, Nami, Tobias Bauer, Zbigniew Polanski, Davor Solter, et Takashi Hiiragi. 2005. « Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned ». *Genes & Development* 19 (9): 1081-92. <https://doi.org/10.1101/gad.1304805>.
- Motosugi, Nami, Jens-Erik Dietrich, Zbigniew Polanski, Davor Solter, et Takashi Hiiragi. 2006. « Space Asymmetry Directs Preferential Sperm Entry in the Absence of Polarity in the Mouse Oocyte ». *PLoS Biology* 4 (5): e135. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040135>.
- Mullen, R. J., C. R. Buck, et A. M. Smith. 1992. « NeuN, a Neuronal Specific Nuclear Protein in Vertebrates ». *Development (Cambridge, England)* 116 (1): 201-11.
- Murapa, Patience, Siva Gandhapudi, Hollie S. Skaggs, Kevin D. Sarge, et Jerold G. Woodward. 2007. « Physiological Fever Temperature Induces a Protective Stress Response in T Lymphocytes Mediated by Heat Shock Factor-1 (HSF1) ». *The Journal of Immunology* 179 (12): 8305-12. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.12.8305>.
- Murphy, S. P., J. J. Gorzowski, K. D. Sarge, et B. Phillips. 1994. « Characterization of Constitutive HSF2 DNA-Binding Activity in Mouse Embryonal Carcinoma Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 14 (8): 5309-17.
- Nadarajah, B., P. Alifragis, R. O. L. Wong, et J. G. Parnavelas. 2003. « Neuronal Migration in the Developing Cerebral Cortex: Observations Based on Real-Time Imaging ». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 13 (6): 607-11.
- Nakagawa, Y., J. E. Johnson, et D. D. O'Leary. 1999. « Graded and Areal Expression Patterns of Regulatory Genes and Cadherins in Embryonic Neocortex Independent of Thalamocortical Input ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19 (24): 10877-85.

- Nicholls, Susan, Michelle D. Leach, Claire L. Priest, et Alistair J. P. Brown. 2009. « Role of the Heat Shock Transcription Factor, Hsf1, in a Major Fungal Pathogen That Is Obligately Associated with Warm-Blooded Animals ». *Molecular Microbiology* 74 (4): 844-61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06883.x>.
- Nieouillon, André, et Antoine Coquerel. 2003. « Dopamine: A Key Regulator to Adapt Action, Emotion, Motivation and Cognition ». *Current Opinion in Neurology* 16 Suppl 2 (décembre): S3-9.
- Nieto, Marta, Edwin S. Monuki, Hua Tang, Jaime Imitola, Nicole Haubst, Samia J. Khoury, Jim Cunningham, Magdalena Gotz, et Christopher A. Walsh. 2004. « Expression of Cux-1 and Cux-2 in the Subventricular Zone and Upper Layers II-IV of the Cerebral Cortex ». *The Journal of Comparative Neurology* 479 (2): 168-80. <https://doi.org/10.1002/cne.20322>.
- Okano, Masaki, Daphne W. Bell, Daniel A. Haber, et En Li. 1999. « DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development ». *Cell* 99 (3): 247-57. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6).
- Parnavelas, J. G. 2000. « The Origin and Migration of Cortical Neurones: New Vistas ». *Trends in Neurosciences* 23 (3): 126-31.
- Parsell, D. A., J. Taulien, et S. Lindquist. 1993. « The Role of Heat-Shock Proteins in Thermotolerance ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 339 (1289): 279-85; discussion 285-286. <https://doi.org/10.1098/rstb.1993.0026>.
- Perea-Gomez, Aitana, Anne Camus, Anne Moreau, Kate Grieve, Gael Moneron, Arnaud Dubois, Christian Cibert, et Jérôme Collignon. 2004. « Initiation of Gastrulation in the Mouse Embryo Is Preceded by an Apparent Shift in the Orientation of the Anterior-Posterior Axis ». *Current Biology* 14 (3): 197-207. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.01.030>.
- Perea-Gomez, Aitana, Sigolène M Meilhac, Karolina Piotrowska-Nitsche, Dionne Gray, Jérôme Collignon, et Magdalena Zernicka-Goetz. 2007. « Regionalisation of the mouse visceral endoderm as the blastocyst transforms into the egg cylinder ». *BMC Developmental Biology* 7 (août): 96. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-96>.
- Perera, Frederica, et Julie Herbstman. 2011. « Prenatal Environmental Exposures, Epigenetics, and Disease ». *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)* 31 (3): 363-73. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.12.055>.
- Probst, Aline V., Elaine Dunleavy, et Geneviève Almouzni. 2009. « Epigenetic Inheritance during the Cell Cycle ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (3): 192-206. <https://doi.org/10.1038/nrm2640>.
- Rabindran, S. K., R. I. Haroun, J. Clos, J. Wisniewski, et C. Wu. 1993. « Regulation of Heat Shock Factor Trimer Formation: Role of a Conserved Leucine Zipper ». *Science* 259 (5092): 230-34. <https://doi.org/10.1126/science.8421783>.
- Radulovic, J., J. Kammermeier, et J. Spiess. 1998. « Generalization of Fear Responses in C57BL/6N Mice Subjected to One-Trial Foreground Contextual Fear Conditioning ». *Behavioural Brain Research* 95 (2): 179-89.
- Rallu, M., Mt. Loones, Y. Lallemand, R. Morimoto, M. Morange, et V. Mezger. 1997. « Function and regulation of heat shock factor 2 during mouse embryogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (6): 2392-97.
- Ritossa, F. 1962. « A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in Drosophila ». *Experientia* 18 (12): 571-73. <https://doi.org/10.1007/BF02172188>.

- Rivera-Pérez, Jaime A., et Anna-Katerina Hadjantonakis. 2015. « The Dynamics of Morphogenesis in the Early Mouse Embryo ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015867>.
- Robinson, T. E., et J. B. Becker. 1986. « Enduring Changes in Brain and Behavior Produced by Chronic Amphetamine Administration: A Review and Evaluation of Animal Models of Amphetamine Psychosis ». *Brain Research* 396 (2): 157-98.
- Robinson, T. E., et K. C. Berridge. 1993. « The Neural Basis of Drug Craving: An Incentive-Sensitization Theory of Addiction ». *Brain Research. Brain Research Reviews* 18 (3): 247-91.
- Robinson, T. E., et B. Kolb. 1999. « Alterations in the Morphology of Dendrites and Dendritic Spines in the Nucleus Accumbens and Prefrontal Cortex Following Repeated Treatment with Amphetamine or Cocaine ». *The European Journal of Neuroscience* 11 (5): 1598-1604.
- Rubert, Gemma, Rosa Miñana, Maria Pascual, et Consuelo Guerri. 2006. « Ethanol Exposure during Embryogenesis Decreases the Radial Glial Progenitorpool and Affects the Generation of Neurons and Astrocytes ». *Journal of Neuroscience Research* 84 (3): 483-96. <https://doi.org/10.1002/jnr.20963>.
- Santillano, Daniel R., Leena S. Kumar, Terasa L. Prock, Cynthia Camarillo, Joseph D. Tingling, et Rajesh C. Miranda. 2005. « Ethanol Induces Cell-Cycle Activity and Reduces Stem Cell Diversity to Alter Both Regenerative Capacity and Differentiation Potential of Cerebral Cortical Neuroepithelial Precursors ». *BMC Neuroscience* 6 (septembre): 59. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-6-59>.
- Santos, Fátima, et Wendy Dean. 2004. « Epigenetic Reprogramming during Early Development in Mammals ». *Reproduction (Cambridge, England)* 127 (6): 643-51. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00221>.
- Sarge, K. D., O. K. Park-Sarge, J. D. Kirby, K. E. Mayo, et R. I. Morimoto. 1994. « Expression of Heat Shock Factor 2 in Mouse Testis: Potential Role as a Regulator of Heat-Shock Protein Gene Expression during Spermatogenesis ». *Biology of Reproduction* 50 (6): 1334-43.
- Seabold, Gail K., James B. Daunais, Andrew Rau, Kathleen A. Grant, et Veronica A. Alvarez. 2010. « DiOLISTIC Labeling of Neurons from Rodent and Non-Human Primate Brain Slices ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 41 (juillet). <https://doi.org/10.3791/2081>.
- Shen, Hao-wei, Shigenobu Toda, Khaled Moussawi, Ashley Bouknight, Daniel S. Zahm, et Peter W. Kalivas. 2009. « Altered Dendritic Spine Plasticity in Cocaine-Withdrawn Rats ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (9): 2876-84. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5638-08.2009>.
- Sherazee, Nyssa, et Veronica A. Alvarez. 2013. « DiOlistics: Delivery of Fluorescent Dyes into Cells ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 940: 391-400. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-110-3\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-110-3_28).
- Snow, M. H. L. 1977. « Gastrulation in the Mouse: Growth and Regionalization of the Epiblast ». *Development* 42 (1): 293-303.
- Sorger, Peter K. 1991. « Heat Shock Factor and the Heat Shock Response ». *Cell* 65 (3): 363-66. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90452-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90452-5).
- Staffend, Nancy A., et Robert L. Meisel. 2011. « DiOlistic Labeling in Fixed Brain Slices: Phenotype, Morphology, and Dendritic Spines ». *Current Protocols in Neuroscience* Chapter 2 (avril): Unit 2.13. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0213s55>.

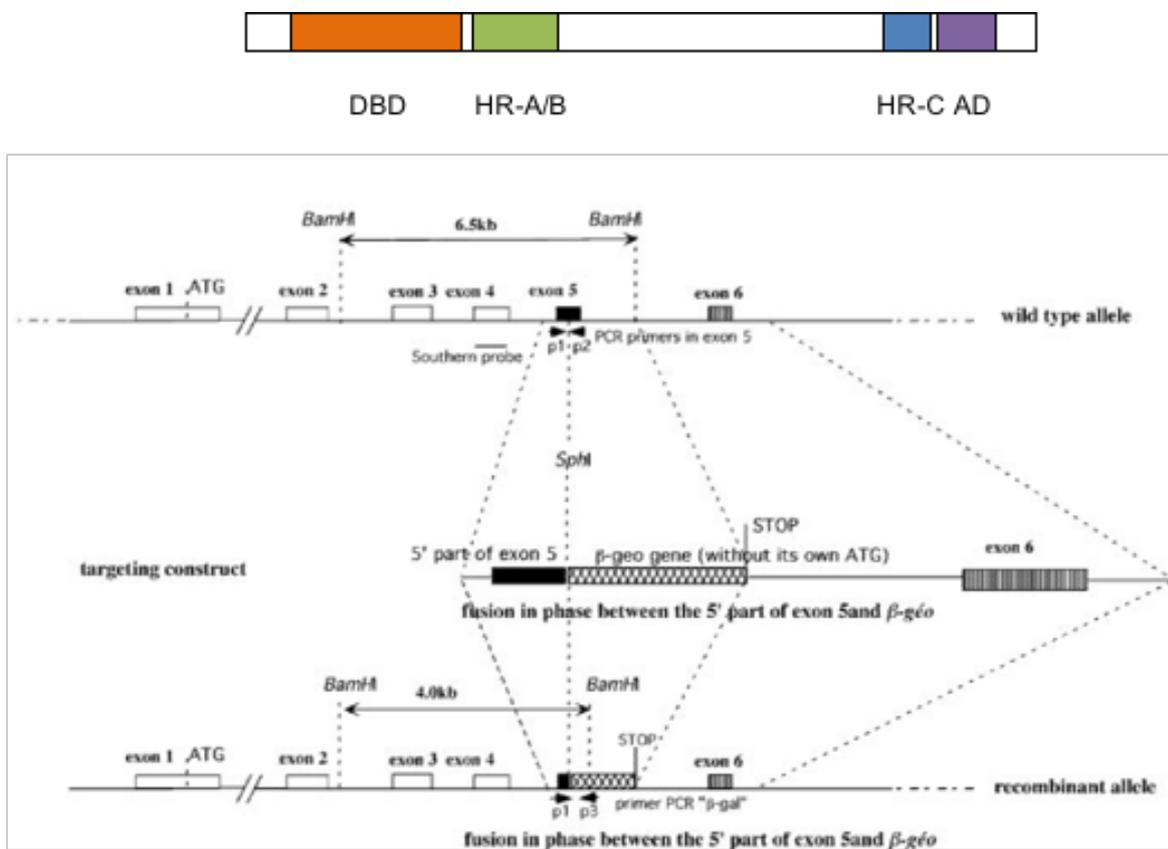
- Stiedl, O., J. Radulovic, R. Lohmann, K. Birkenfeld, M. Palve, J. Kammermeier, F. Sananbenesi, et J. Spiess. 1999. « Strain and Substrain Differences in Context- and Tone-Dependent Fear Conditioning of Inbred Mice ». *Behavioural Brain Research* 104 (1-2): 1-12.
- Stuhlmiller, Timothy J., et Martín I. García-Castro. 2012. « Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 69 (22): 3715-37. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0991-8>.
- Surani, M. A., S. C. Barton, et M. L. Norris. 1984. « Development of Reconstituted Mouse Eggs Suggests Imprinting of the Genome during Gametogenesis ». *Nature* 308 (5959): 548-50.
- Suvrathan, Aparna, Sharath Bennur, Supriya Ghosh, Anupratap Tomar, Shobha Anilkumar, et Sumantra Chattarji. 2014. « Stress Enhances Fear by Forming New Synapses with Greater Capacity for Long-Term Potentiation in the Amygdala ». *Phil. Trans. R. Soc. B* 369 (1633): 20130151. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0151>.
- Tarkowski, Andrzej K., Aneta Suwińska, Renata Czołowska, et Waclaw Ożdżeński. 2010. « Individual Blastomeres of 16- and 32-Cell Mouse Embryos Are Able to Develop into Foetuses and Mice ». *Developmental Biology* 348 (2): 190-98. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.09.022>.
- Tatton, W. G., et C. W. Olanow. 1999. « Apoptosis in Neurodegenerative Diseases: The Role of Mitochondria ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1410 (2): 195-213.
- « The House Mouse ». s. d. Consulté le 14 juin 2018. [https://www.emouseatlas.org/emap/ema/theiler\\_stages/house\\_mouse/book.html](https://www.emouseatlas.org/emap/ema/theiler_stages/house_mouse/book.html).
- Thompson, Barbara L., Pat Levitt, et Gregg D. Stanwood. 2009. « Prenatal Exposure to Drugs: Effects on Brain Development and Implications for Policy and Education ». *Nature Reviews. Neuroscience* 10 (4): 303-12. <https://doi.org/10.1038/nrn2598>.
- Tordera, V., R. Sendra, et J. E. Pérez-Ortín. 1993. « The Role of Histones and Their Modifications in the Informative Content of Chromatin ». *Experientia* 49 (9): 780-88.
- Trinklein, Nathan D., John I. Murray, Sara J. Hartman, David Botstein, et Richard M. Myers. 2004. « The Role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the Genome-wide Regulation of the Mammalian Heat Shock Response ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (3): 1254-61. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-10-0738>.
- Valenzuela, C. Fernando, Russell A. Morton, Marvin R. Diaz, et Lauren Topper. 2012. « Does Moderate Drinking Harm the Fetal Brain? Insights from Animal Models ». *Trends in Neurosciences* 35 (5): 284-92. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.006>.
- Wang, Guanghu, Jing Zhang, Demetrius Moskophidis, et Nahid F. Mivechi. 2003. « Targeted Disruption of the Heat Shock Transcription Factor (Hsf)-2 Gene Results in Increased Embryonic Lethality, Neuronal Defects, and Reduced Spermatogenesis ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 36 (1): 48-61. <https://doi.org/10.1002/gene.10200>.
- Xie, Zheng-Hua, Yan-Nv Huang, Zhao-Xia Chen, Arthur D. Riggs, Jian-Ping Ding, Humaira Gowher, Albert Jeltsch, Hiroyuki Sasaki, Kenichiro Hata, et Guo-Liang Xu. 2006. « Mutations in DNA Methyltransferase DNMT3B in ICF Syndrome Affect Its Regulation by DNMT3L ». *Human Molecular Genetics* 15 (9): 1375-85. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl059>.

- Zahm, D. S. 1999. « Functional-Anatomical Implications of the Nucleus Accumbens Core and Shell Subterritories ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 877 (juin): 113-28.
- Zernicka-Goetz, Magdalena. 2004. « First cell fate decisions and spatial patterning in the early mouse embryo ». *Seminars in Cell & Developmental Biology, Biology of Lysophosphatidic Acid and Sphingosine 1-phosphate and Polarity in Mammalian Development*, 15 (5): 563-72. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2004.04.004>.
- Zhou, F. C., Y. Sari, J. K. Zhang, C. R. Goodlett, et T. Li. 2001. « Prenatal Alcohol Exposure Retards the Migration and Development of Serotonin Neurons in Fetal C57BL Mice ». *Brain Research. Developmental Brain Research* 126 (2): 147-55.

# Annexes

# Annexes

## Annexe 1 : Construction du modèle murin Knock-Out Hsf2



**Kallio et al, 2002**

## **Annexe 2 : Protocole d'Hybridation In Situ sur lames**

### Premier jour :

- Sécher les lames à l'air libre
- PBS Rincer brièvement

### *Perméabilisation et post fixation*

J'ai testé deux techniques de perméabilisation, avec des agents qui permettent de perforer la membrane plasmique des cellules :

- **La protéinase K (PK)** : cette enzyme dégrade les protéines membranaires. PK, à 10µg/ml de PK dans PBS Tween-20 (PBT) à 0,1%. Incubation des coupes 3min sous agitation
- **La solution RIPA** : cette solution est un mix de détergents qui dégrade les lipides membranaires.
  - 1%NP-40
  - 1%SDS
  - 0,5% Na Déoxycholate
  - 50mM tris pH8
  - 1mM EDTA
  - 150mM NaCl

Incubation 2X10min sous agitation

- Post- fixation dans 4% PFA 15min à RT sous agitation
- PBS 3 X 5 min à RT sous agitation
- 3% H2O2 dans du PBS 3 X 5 min à RT sous agitation
- Triethanolamine+0,25% acétique anhydre 15 min à RT sous agitation
- PBS 2 X 5 min à RT sous agitation
- PBS +0,05% Tween20 (PBT) 1 X 5 min à RT sous agitation

### *Préhybridation et Hybridation*

Préhybridation dans Hyb buffer 1H à 70°C (300µl/lame) -sous agitation  
Hybridation ON à 70°C (300µl/lame) - sous agitation  
(100à 1000ng/ml de DIG dans Hyb Buffer)

### Deuxième jour :

- Solution de lavage X1 1H à 70°C sous agitation
- Solution de lavage X2 1H à 70°C sous agitation
  
- MABT 3X 10min à RT sous agitation
- Bloquer avec 10% FCS dans MABT 1H- 2H à RT sous agitation
- Incubation avec l'anticorps ON à 4°C sous agitation  
(anti-DIG 1/2000 dans 2%FCS dans du MABT)

Troisième jour :

- MABT 5min à RT sous agitation
  - NTMT pH9,5 (extemporané) 2X 15min à RT sous agitation
  - *Révélation*
    - 4,5µl/ml NBT et 3,5µl/ml BCIP dans NTMT (Incuber dans le noir)
- Vérifier le signal toutes les heures
- NTMT pH9,5 20 min ou plus à RT sous agitation
  - PBT 3X 10min sous agitation
  
  - Après le marquage, les coupes sont séchées et incluses entre lame et lamelle, dans un milieu de montage à base de glycérol, le *mowiol*

*Solutions:*

**Hybridation buffer:** 50%formamide, 5X SSC,250µg/ml yeast RNA, 500µg/ml herring sperm, 5X Denhart's

**Solution X1:** 50% formamide, 2X SSC, 1% SDS)

**Solution X2:** 0,2% SSC, 1%SDS

**MABT pH 7,5:** 100mM acide maléique, 150mM NaCl, 0,1% Tween20

**NTMT pH 9,5:** 100mM NaCl, Tris pH 9,5, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Tween20.

**Annexe 3 : Protocole d'hybridation in situ sur coupes flottantes**Premier jour :

- PBS +0,1% Tween (PBT) 10min à RT sous agitation
- PBT 10min à RT sous agitation

*Déshydratation et réhydratation*

1. 25% EtOH dans du PBS 5min sous agitation
  2. 50% EtOH dans du PBS 5min sous agitation
  3. 75% EtOH dans du PBS 5min sous agitation
  4. 100% EtOH dans du PBS 5min sous agitation
  
  5. 100% EtOH dans du PBS 5min sous agitation
  6. 100% EtOH dans du PBS 5min sous agitation
  
  7. 75% EtOH dans du PBS 5min sous agitation
  8. 50% EtOH dans du PBS 5min sous agitation
  9. 25% EtOH dans du PBS 5min sous agitation
- PBT Rincer
  - PBT 10min à RT sous agitation

*Perméabilisation et Post-Fixation*

J'ai testé deux techniques de perméabilisation, avec des agents qui permettent de perforer la membrane plasmique des cellules :

- **La protéinase K (PK)** : cette enzyme dégrade les protéines membranaires. PK, à 10µg/ml de PK dans PBS Tween-20 (PBT) à 0,1%. Incubation des coupes 3min sous agitation
  
- **La solution RIPA** : cette solution est un mix de détergents qui dégrade les lipides membranaires.
  - 1%NP-40
  - 1%SDS
  - 0,5% Déoxycholate
  - 50mM tris pH8
  - 1mM EDTA
  - 150mM NaCl
  -

Incubation 2X30min sous agitation

4% PFA + 0,2% Glutaraldéhyde 30min à RT sous agitation

- PBT Rincer

- PBT 10min à RT sous agitation

*Préhybridation et Hybridation*

- Préhybridation 1H à 70°C sous agitation
- Hybridation (10µg/ml de Hyb Buffer) ON à 70°C sous agitation

Deuxième jour :

- Solution de lavage X1 2X Rincer
- Solution de lavage X1 1H à 70°C sous agitation
- Solution de lavage X2 1H à 70°C sous agitation
  
- MABT 2X Rincer
- MABT 2X 1H à RT sous agitation
  
- Bloquer avec 10% FCS dans MABT 1H- 2H à RT sous agitation
  
- Incubation avec l'anticorps 1H- 2H à 4°C sous agitation  
(anti-DIG 1/2000 dans 2%FCS dans du MABT)

Troisième jour :

- MABT 2X Rincer
- MABT 2X 1H à RT sous agitation
  
- NTMT pH9,5 (extemporané) 2X 20min à RT sous agitation
  
- *Révélation*
  
- 4,5µl/ml NBT et 3,5µl/ml BCIP dans NTMT (Incuber dans le noir)  
Vérifier le signal toutes les heures
  
- NTMT pH9,5 20 min ou plus à RT
- PBT 10min
- 
- Après le marquage, les coupes sont montées sur lame, séchées et incluses entre lame et lamelle, dans un milieu de montage à base de glycérol, le *mowiol*.

*Solutions:*

**Hybridation buffer:** 50%formamide, 5X SSC,250µg/ml yeast RNA, 500µg/ml herring sperm, 5X Denhart's

**Solution X1:** 50% formamide, 2X SSC, 1% SDS)

**Solution X2:** 0,2% SSC, 1%SDS

**MABT pH 7,5 :** 100mM acide maléique, 150mM NaCl, 0,1% Tween20

**NTMT pH 9,5:** 100mM NaCl, Tris pH 9,5, 50mM MgCl2, 0,5% Tween20.

# Résumé

---

Les HSFs, Heat Shock Factor, sont des facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress cellulaire. En 1962, Ferruccio Ritossa montre le rôle de HSF chez la drosophile, en réponse au stress thermique. En réponse au stress cellulaire, les HSFs s'activent, et fixent des gènes cibles, tel que les gènes qui codent les protéines « chaperons » : les HSPs (*Heat Shock Protein*), et régulent ainsi leur transcription.

Notre équipe a mis en évidence le rôle majeur de HSF2 dans la réponse au stress alcoolique, en lien avec le syndrome d'alcoolisation fœtale. C'est la cause la plus importante de retard mental d'origine non génétique. L'équipe a montré que l'exposition prénatale à l'alcool induit des défauts développementaux chez la souris.

L'équipe a aussi montré l'implication majeure de HSF2 dans le développement embryonnaire en conditions physiologiques. L'absence de l'expression de *Hsf2*, induit des défauts de migration neuronale, et d'organisation des couches corticales dans le cerveau embryonnaire. HSF2 est donc essentiel dans de nombreux processus développementaux physiologiques, et s'en détourne en cas de stress alcoolique. Cela conduit à des changements de cibles moléculaires, induisant des défauts morphologiques dans le cerveau embryonnaire, et serait à l'origine de troubles comportementaux chez l'adulte.

Pour mieux comprendre ces deux grandes fonctions du facteur, j'ai caractérisé le phénotype morphologique et cellulaire des souris adultes *Hsf2* KO. Ces travaux montrent que l'absence de HSF2, conduit à des défauts morphologiques et dendritiques dans le cerveau de souris adultes, suggérant des défauts de transmissions synaptiques.

**Mots clés :** HSF, Stress, Alcool, Transcription, Epigénome, Cerveau, Morphologie, Synapse

## **FONCTIONS DU FACTEUR HSF2 EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES ET AU COURS DU STRESS ALCOOLIQUE**

**MYRIAME MOHAMED**

### **RESUME**

Les HSFs, Heat Shock Factor, sont des facteurs de transcription impliqués dans la réponse au stress cellulaire. En 1962, Ferruccio Ritossa montre le rôle de HSF chez la drosophile, en réponse au stress thermique. En réponse au stress cellulaire, les HSFs s'activent, et fixent des gènes cibles, tel que les gènes qui codent les protéines « chaperons » : les HSPs (*Heat Shock Protein*), et régulent ainsi leur transcription.

Notre équipe a mis en évidence le rôle majeur de HSF2 dans la réponse au stress alcoolique, en lien avec le syndrome d'alcoolisation fœtale. C'est la cause la plus importante de retard mental d'origine non génétique. L'équipe a montré que l'exposition prénatale à l'alcool induit des défauts développementaux chez la souris.

L'équipe a aussi montré l'implication majeure de HSF2 dans le développement embryonnaire en conditions physiologiques. L'absence de l'expression de *Hsf2*, induit des défauts de migration neuronale, et d'organisation des couches corticales dans le cerveau embryonnaire. HSF2 est donc essentiel dans de nombreux processus développementaux physiologiques, et s'en détourne en cas de stress alcoolique. Cela conduit à des changements de cibles moléculaires, induisant des défauts morphologiques dans le cerveau embryonnaire, et serait à l'origine de troubles comportementaux chez l'adulte.

Pour mieux comprendre ces deux grandes fonctions du facteur, j'ai caractérisé le phénotype morphologique et cellulaire des souris adultes *Hsf2* KO. Ces travaux montrent que l'absence de HSF2, conduit à des défauts morphologiques et dendritiques dans le cerveau de souris adultes, suggérant des défauts de transmissions synaptiques.

**Mots clés :** HSF, Stress, Alcool, Transcription, Epigénome, Cerveau, Morphologie, Synapse