

Le lignage cellulaire dans le cerveau du zebrafish des cellules progénitrices aux cellules souches

Date : 02/04/2009

Laboratory
Equipe "Réseaux génétiques et morphodynamiques cellulaires"
CNRS-DEPSN UPR 2197
INAF bat 33
Avenue de la Terrasse
91198 Gif sur Yvette
Director : Philippe Vernier

PhD Supervisor
Nadine Peyriéras
email : nadine.peyrieras@inaf.cnrs-gif.fr
phone : +33 1 69 82 41 42

Subjects / Tools-Methodologies:

- 1 : Embryology / Imagerie 4D
- 2 : Maths Appliquées / Reconstruction phénoménologique
- 3 : BioPhysique / Reconstruction théorique

Summary of lab's interests

Nos recherches sont fondées sur une approche « systèmes complexes » des processus de la morphogenèse animale. Il s'agit de mettre en Suvre une approche à la fois expérimentale et théorique permettant de valider la méthodologie souvent invoquée et jusque-là très incomplètement validée d'un cercle vertueux entre modélisation, simulation et expérimentation. Le succès d'une telle approche nécessite de fonder modélisation et expérimentation sur une représentation commune des phénomènes biologiques, des processus en jeu, des composants observés et des paramètres pertinents. Nos modèles expérimentaux sont principalement l'embryogenèse du zebrafish (*Danio rerio*), de l'oursin (*Paracentrotus lividus* et *Strongylocentrotus purpuratus* ce dernier en collaboration avec Eric Davidson Caltech) de l'ascidie *Phallusia mammillata*, et de l'amphioxus *Brachyostoma lanceolatum*. Nous pourrions aussi valider prochainement nos stratégies d'observation et de reconstruction pour l'embryogenèse précoce de la souris *Mus musculus* (collaboration Gilles Fortin DEPSN Gif-sur-Yvette). Le choix de ces modèles est justifié par les fondements de l'approche proposée par notre laboratoire et son partenaire le CREA (UMR 7656). Nous avons en effet dans le contexte de projets collaboratifs (STREP NEST Embryomics et BioEmergences et ANR BioSys) validé une stratégie de reconstruction des comportements cellulaires dans ces organismes à partir d'imagerie 4D in vivo. La reconstruction informatique de la morphogenèse permet d'envisager : d'une part l'utilisation des mesures pour alimenter les modèles et d'autre part l'expérimentation à même de valider les modèles. Il s'agit de fonder la reconstruction des dynamiques multi échelles en intégrant les dynamiques des réseaux d'interaction moléculaires, génétiques et cellulaires. L'enjeu de ce type d'approche qui n'est pas encore classique dans le domaine de la biologie du développement est de montrer son potentiel dans l'élucidation des propriétés systémiques des systèmes biologiques telles que la robustesse ou l'homéostasie. Ces choix conceptuels et méthodologiques sont mis en Suvre dans des contextes particuliers qui doivent à la fois permettre de valider les approches et aussi de répondre à certaines questions majeures de l'embryologie.

Summary of project

Prolifération cellulaire et morphogenèse : le lignage cellulaire dans le cerveau du zebrafish des cellules progénitrices aux cellules souches La reconstruction systématique du lignage cellulaire dans l'embryon de zebrafish fournit les

mesures adéquates pour corrélérer le taux de prolifération cellulaire aux événements de la morphogenèse. De l'embryogenèse à l'organisme adulte, l'hypothèse courante est que le taux de prolifération cellulaire le long des lignages varie jusqu'à l'absence de prolifération des cellules différenciées et le maintien d'un taux de prolifération des cellules souches de l'organe. Il s'agit ici de suivre au moyen d'imagerie 4D des clones de cellules marquées par une stratégie de marquage aléatoire (expression d'un marquage nucléaire par l'expression d'une fusion H2B/eGFP sous contrôle de séquences régulatrices ubiquitaires et dépendant d'une recombinaison intragénique par une recombinase CRE/ERT activée en présence de tamoxifène), dans le contexte de l'expression d'un marquage membranaire sous contrôle d'un transgène supposé marquer les populations de cellules souches neurales (GFAP :mcherry-F). L'imagerie 4D in toto d'un compartiment morphologique permet de reconstruire phénoménologiquement le lignage cellulaire puis de caractériser les modes de prolifération cellulaire. Nous avons validé cette approche dans les Projets CE Embryomics et BioEmergences en reconstruisant le lignage cellulaire dans les étapes précoces de la morphogenèse du cerveau chez *Danio rerio*. Les changements de régime dans le taux de prolifération cellulaire doivent corrélérer avec des caractéristiques du voisinage cellulaire et de ses propriétés: - Persistance de voisinage, - Propriétés visco élastiques du tissu (mesurées au moyen des déformations de voisinage au cours du temps et notamment lors des divisions cellulaires), - Changements de morphologie cellulaire mesurés à partir de la segmentation des membranes, - Caractéristiques de la prolifération cellulaire (symétrique ou asymétrique), - Activité calcique (observée au moyen de l'imagerie 4D d'un senseur de la concentration en calcium intracellulaire, G-CAMP ou Pericam), - Activité métabolique redox (mesurée au moyen d'une imagerie ratiométrique en excitation biphotonique de NAD(P)H et flavoprotéines oxydées). Nous avons montré la puissance de nos stratégies d'imagerie 4D soit biphotonique à balayage laser (MLSM) soit par excitation de plan (SPIM/DSLIM) et de chaînes algorithmiques de traitement d'images pour reconstruire le lignage cellulaire au cours de l'embryogenèse précoce d'animaux modèles dont le zebrafish (*Danio rerio*). Il s'agit maintenant d'utiliser ces stratégies pour reconstruire le lignage cellulaire au moyen de l'imagerie 4D d'un volume cellulaire suivi sur de longues périodes éventuellement dans des animaux différents pour garantir la survie cellulaire de manière à obtenir des séquences 4D qui se recouvrent partiellement dans le temps et ainsi suivre au moins en probabilité le lignage cellulaire au sein d'un compartiment choisi. Nous utiliserons pour cela une lignée de zebrafish dépourvue de pigments afin de suivre aussi longtemps que possible un même lignage cellulaire au sein du tissu nerveux. Cette stratégie doit conduire à la caractérisation des conditions de maintien de la prolifération cellulaire et à la caractérisation des propriétés d'une hypothétique « niche » des cellules souches ainsi qu'à la mise en évidence de la dynamique cellulaire au sein de cette niche. Cette phénoménologie cellulaire servira de fondement à l'intégration des processus aux autres niveaux d'observation dont les niveaux moléculaires et génétiques. Un modèle au moins qualitatif sera élaboré pour tenter de reconstruire une chaîne causale d'événements sous-jacente aux modes de prolifération observés. Il sera alors possible de tester les prédictions du modèle au moyen de la transplantation à des stades précoces du développement de cellules mutantes pour certaines voies de signalisation et susceptibles de perturber le développement, le fonctionnement ou le maintien de cellules progénitrices ou souches du tissu nerveux.