

Faculté de pharmacie
et des sciences biomédicales

Effets d'une mutation humaine de *CELSR3* sur le développement du système nerveux de la souris

Auteur : Emilie Doeraene
Promoteur : Fadel Tissir
Année académique 2020-2021
SBIM22MA finalité approfondie en neurosciences

Remerciements

Ce mémoire de Master est le fruit d'un stage de recherche scientifique d'un an dans le laboratoire DENE de l'UCLouvain. Durant cette année, j'ai pu me confronter à ce qu'est la vie de chercheur, ce qui m'a permis de m'enrichir à la fois d'un point de vue scientifique mais également personnel. C'est pourquoi je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail durant cette année très particulière.

Premièrement, je remercie le professeur Fadel Tissir de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir guidée dans mon travail et de m'avoir fait confiance afin mener à bien mon projet sans encadrant.

Ensuite, je tiens à remercier tout particulièrement Nuria Ruiz Reig et Georges Chehade qui malgré le départ prématuré de mon encadrant ont été des références pour moi. Ils ont toujours su me consacrer du temps afin de répondre à mes questions techniques mais également pour discuter du fond, de l'analyse et des perspectives de mon projet. Ils m'ont aussi permis de remettre de l'ordre dans mes idées et d'apprendre de mes erreurs afin de devenir une meilleure chercheuse mais également une meilleure personne.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à Isabelle Lambermont qui a toujours été disponible afin de m'aider et de me soutenir. Elle a été comme une maman de laboratoire pour moi et m'a montré ce que pouvait être la vraie vie en tant que chercheur.

Je voudrais adresser un remerciement particulier à Olivier Schakman de m'avoir accueillie moi et mes souris dans sa plateforme. Sa gentillesse et sa joie de vivre m'ont permis de voir d'une autre manière ma relation avec les animaux dans le cadre de la recherche.

Enfin, je tiens tout particulièrement à remercier mes proches dont mes parents qui m'ont permis de faire des études qui me passionnent, mon copain dont le soutien est sans faille même dans les moments les plus durs. Mais je tiens à souligner le travail de ma maman qui a passé de nombreuses heures à corriger un nombre de fautes d'orthographe non négligeables.

Donc un grand merci à tout ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de mon mémoire mais également à la construction de la personne que je suis aujourd'hui.

Résumé

Le gène *CELSR3* est crucial pour le guidage axonal et le câblage du cerveau. Des études de perte de fonction chez la souris ont démontrées un rôle important de ce gène dans la croissance dirigée des axones, la formation des synapses et la connectivité cérébrale. Chez l'homme, une mutation faux-sens dans le gène *CELSR3* (9355 A>G) est associée à un déficit intellectuel sévère, à un retard de langage et de développement psychomoteur ainsi qu'à un diabète insipide. Une analyse des connexions neuronales par imagerie par résonance magnétique (IRM) n'a pas révélé d'anomalie sévère, suggérant que la mutation n'induit que de déficits subtils de guidage et de connectivité. C'est pourquoi, nous avons étudié un modèle animal de cette mutation d'un point de vue cognitif, métabolique et histologique. Nous avons réalisé 3 tests cognitifs comprenant l'Open Field, le labyrinthe en Y et la piscine de Morris qui nous ont permis de comparer le comportement de souris *Celrs3* KI/KI et *Celsr3* WT de la même portée. Les résultats de ces tests n'ont montré aucunes différences entre les souris mutantes et les souris contrôles que ce soit pour la mémoire, l'apprentissage, l'anxiété ou la locomotion. Ensuite, nous avons réalisé des tests métaboliques, les souris ont été mises durant 24h dans des physio-cages qui permettent d'évaluer la consommation d'eau et de nourriture mais aussi l'activité. Et comme pour les tests cognitifs, il n'y a aucune différence entre les souris contrôles et mutantes pour ce test. Ensuite, nous avons analysé le volume et l'osmolarité urinaire mais nous n'avons trouvé aucune différence entre les souris *Celsr3* KI/KI et *Celsr3* WT suggérant que la mutation humaine n'induit pas le diabète insipide chez la souris. Par la suite, nous avons suivi l'évolution du poids de souris *Celsr3* KI/KI et leurs pendant WT au fil des semaines (10 semaines). Mais aucune différence de poids significative n'a été mesurée entre les deux types de souris. En plus d'une analyse de poids, nous avons mesuré par ELISA la concentration plasmatique des différentes hormones impliquées dans le circuit de contrôle de la faim. Pour la Leptine, la Cholécystokinine et le Ghréline, il n'y a aucune différence de concentration plasmatique entre les souris *Celrs3* KI/KI et *Celsr3* WT. Cependant, nous avons observé que la concentration plasmatique en Insuline est plus élevée chez les souris possédant la mutation humaine. Enfin d'un point de vue histologique, nous n'avons trouvé aucunes anomalies chez les souris *Celsr3* KI/KI confirmant que ces souris ne montrent pas le même phénotype pathologique que l'Homme. Cependant, chez les souris dont le gène *Celsr3* est délété, nous avons observé une différence d'organisation axonale qui pourrait être soit due à des problèmes de croissance axonale soit à des problèmes de maintien de ces connexions.

Abstract

The *CELSR3* gene is crucial for axonal guidance and brain wiring. Studies of loss of function in mice have demonstrated an important role of this gene in directed axon growth, synapse formation and brain connectivity. In humans, a false sense mutation in the *CELSR3* gene (9355 A>G) is associated with severe intellectual deficit, delayed language and psychomotor development and diabetes insipidus. An analysis of neuronal connections by MRI imaging did not reveal any severe abnormality, suggesting that the mutation induces only subtle guidance and connectivity deficits. Therefore, we studied an animal model of this mutation from a cognitive, metabolic and histological point of view. We performed 3 cognitive tests including the Open Field, the Y maze and the Morris Pool which allowed us to compare the behavior of *Celrs3* KI/KI and *Celrs3* WT mice of the same litter. The results of these tests showed no differences between mutant and control mice in memory, learning, anxiety or locomotion. Then, we performed metabolic tests, the mice were put for 24 hours in physio-cages that allow us to evaluate water and food consumption but also activity. And as with the cognitive tests, there was no difference between control and mutant mice in this test. Next, we analyzed urine volume and osmolarity but found no difference between *Celrs3* KI/KI and *Celrs3* WT mice suggesting that the human mutation does not induce diabetes insipidus in mice. Subsequently, we followed the evolution of the weight of *Celrs3* KI/KI mice and their WT counterparts over the weeks. But no significant difference in weight was measured between the two types of mice. In addition to weight analysis, we performed Elisa to measure the plasma concentration of the different hormones involved in the hunger control circuit. For Leptin, Cholecystokinin and Ghrelin, there was no difference in plasma concentration between *Celrs3* KI/KI and *Celrs3* WT mice. However, we observed that the Insulin plasma concentration is higher in mice with the human mutation. Finally, from a histological point of view, we found no abnormalities in *Celrs3* KI/KI mice confirming that these mice do not show the same pathological phenotype as humans. However, in mice with a deleted *Celrs3* gene, we observed a difference in axonal organization which could be either due to problems in axonal growth or problems in maintaining these connections.

Table des matières

Remerciements.....	p 2
Résumés.....	p 3
Table des matières.....	p 5
Liste des abréviations	p 7
Introduction.....	p 8
Matériel et méthodes.....	p 14
Création des modèles animaux	p 14
<i>Celsr3</i> KI /KI.....	p 14
<i>Celsr3</i> KO	p 15
<i>Celsr3</i> ^{Foxg1 cKO}	p 16
Tests cognitifs.....	p 16
Open Field.....	p 16
Labyrinthe en Y.....	p 17
Piscine de Morris.....	p 18
Tests métaboliques.....	p 19
Physio-cages.....	p 19
Mesures de poids.....	p 19
Mesures urinaires	p 20
Récolte de sang et préparation.....	p 20
Elisa Leptine.....	p 20
Elisa Insuline.....	p 22
Elisa Cholécystokinine et Ghréline.....	p 23
Histologie.....	p 24
Fixation et décalcification.....	p 24
<i>Celrs3</i> KI/KI.....	p 24
<i>Celsr3</i> KO.....	p 24
<i>Celsr3</i> ^{Foxg1 cKO}	p 24
Enrobage en OCT et coupe au cryostat	p 25
Coloration à l'Hématoxyline-Éosine.....	p 25
Coloration immuno-histologique des neurofilaments.....	p 26
Coloration immuno-fluorescente de l'ADH.....	p 26
Hybridation in-situ (RNAscope).....	p 27

Prise de photos au microscope.....	p 28
Analyses statistiques.....	p 29
Résultats.....	p 30
Tests cognitifs.....	p 30
Open Field.....	p 30
Labyrinthe en Y.....	p 32
Piscine de Morris.....	p 32
Tests métaboliques.....	p 34
Physio-cages.....	p 34
Mesures de poids.....	p 36
Mesures urinaires	p 36
Elisa	p 37
Histologie.....	p 38
Étude de l'expression de <i>Celsr3</i> par RNAscope.....	p 40
<i>Celsr3</i> KI/KI.....	p 42
<i>Celsr3</i> KO.....	p 43
<i>Celsr3</i> ^{Foxg1 cKO}	p 46
Discussion.....	p 48
Méthodologie.....	p 48
Résultats.....	p 49
Perspectives.....	p 50
Références.....	p 52
Annexes.....	p 54
Abstract.....	p 57

Liste des abréviations :

- **Celsr**: Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor
- **EGF** : facteur de croissance épidermique
- **MRH** : motif de récepteur hormonal
- **SPG** : site de protéolyse d'un récepteur couplé aux protéines G
- **ADH** : hormone antidiurétique
- **AVP** : vasopressine
- **POMC** : proopiomélanocortine
- **AgRP** : Agouti-Related Peptide
- **DAB** : diamino-3,3'benzidine
- **KI** : Knock in
- **KO** : Knock out
- **cKO** : Knock out conditionnel
- **SEM** : erreur standard à la moyenne
- **TMB** : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
- **SA-HRP** : Stréptavidine peroxydase
- **PFA** : para formaldéhyde
- **EDTA** : éthylène diamine tétra-acétique
- **PBS** : tampon phosphate salin
- **TMB** : 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
- **PBST** : PBS avec 0,1% de Triton X-100
- **HS** : sérum de cheval
- **DAPI** : 4',6-diamidino-2-phénylindole
- **E + chiffre** : jour embryonnaire
- **P + chiffre** : jour postnatal
- **RF** : sans RNase

Introduction :

Les Celsr (Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor) 1-3 sont les orthologues mammifères de Flamingo/Starry night de Drosophile (Hadjantonakis, Sheward et al. 1997, Nakayama, Nakajima et al. 1998). Ce sont des protéines de plus de 3000 acides aminés qui possèdent en partie en N-terminale, une répétition de neuf cadhérines, plusieurs domaines qui ressemblent à des facteurs de croissances épidermiques, deux répétitions de laminine de type G, un motif de récepteur hormonal, un site protéolytique d'un récepteur couplé aux protéines G, sept domaines transmembranaires et une partie C-terminale intracellulaire sans motif connu (Figure 1) (Goffinet and Tissir 2017). Les séquences d'acides aminés de ces trois protéines sont identiques à plus de 50 % dans les régions extracellulaires et transmembranaires tandis que leurs extensions cytoplasmiques diffèrent plus, suggérant que cette partie intracellulaire est impliquée dans des cascades cellulaires qui varient d'une protéine à l'autre.

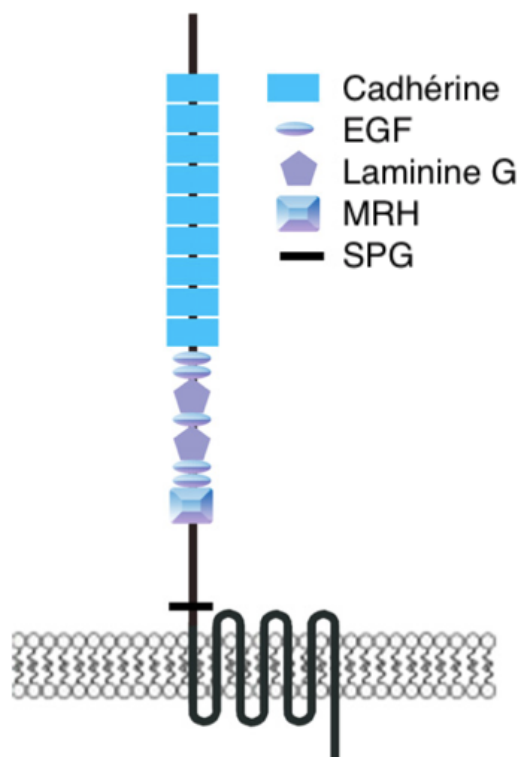


Figure 1 : Représentation schématique des protéines Celsr1-3. Le domaine extracellulaire inclut une répétition de neuf cadhérines, six domaines ressemblants à des domaines de facteur de croissance épidermique (EGF), deux répétitions de laminines de type G, un motif de récepteur hormonal (MRH), et un site de protéolyse d'un récepteur couplé aux protéines G (SPG). Les Celsr sont accrochées à la membrane plasmique grâce à 7 domaines transmembranaires. La queue cytoplasmique varie en taille et est peu conservée entre les Celsr (Tissir and Goffinet 2013).

En plus de leurs séquences en acides aminés différentes, leurs patrons d'expressions diffèrent spatialement et temporellement. En effet, l'ARNm de *Celsr1* est restreint aux zones de prolifération des progéniteurs neuraux, tandis que celui *Celsr3* est détecté uniquement dans les neurones post-mitotiques. L'ARNm de *Cels2* est quant à lui détecté à la fois dans les progéniteurs et les neurones post-mitotiques. De plus, son expression subsiste chez l'adulte (Formstone and Little 2001, Tissir, De-Backer et al. 2002). Enfin, ces différents ARNm sont aussi exprimés de manière variable dans l'épithélium non-neural, ainsi que dans la peau, les poumons, les reins, les cellules endothéliales, les cellules gastro-intestinales et le système reproducteur (Goffinet and Tissir 2017).

L'expression différenciée des *Celsrs* est à la base de rôles différents. En effet, lors du développement embryonnaire, *Celsr1* est exprimé dès la gastrulation et il est impliqué dans la fermeture du tube neural, ainsi que dans la polarité cellulaire planaire. *Celsr2* est exprimé dans le cerveau postnatal et joue un rôle décisif dans la polarité des cils épendymaires et la circulation du liquide céphalorachidien, et *Celsr3* est crucial pour le guidage axonal et le câblage du cerveau. Lorsque *Celsr3* est perdu, on peut observer un déficit dans la formation de la commissure antérieure, de la capsule interne, du lemnisque médian et dans le tractus cortico-spinal. Ces déficits ne sont pas restreints aux axones centraux, mais les axones périphériques sont aussi affectés (Goffinet and Tissir 2017).

Des études de perte de fonction chez la souris ont déjà démontrées le rôle crucial de *Celsr3* dans la guidage axonal et la connectivité cérébrale. De nouvelles données obtenues grâce à une collaboration avec un groupe de recherche à l'hôpital Necker, Enfants Malades ont mis en évidence une mutation faux sens dans ce gène chez l'Homme, associée à un déficit intellectuel sévère, à un retard de langage et de développement psychomoteur ainsi qu'à un diabète insipide (tableau 1). En effet, dans une famille originaire d'Afrique du Nord, deux parents hétérozygotes pour une mutation ponctuelle qui cause une substitution d'une sérine en glycine (9355 A>G), ont donné naissance à trois filles homozygotes pour cette mutation (Figure 2). Une analyse des connections neurales par imagerie de tenseur de diffusion n'a pas révélée d'anomalie, suggérant que la mutation de *Celsr3* n'induit que de subtils déficits de guidage axonale.

Tableau 1 : tableau clinique de trois filles possédant une mutation du gène CELSR3.

Genre	F	F	F
Naissance	24/05/1996	07/10/1999	17/06/2003
Période prénatale/néonatale	Normale	Normale	Normale
Paramètres staturo-pondéraux à la naissance	2770g (Poids), 47cm (Taille), 37 (Circonférence occipito-frontale)	/	2580g (Poids), 47 cm (Taille)
Déficit intellectuel	Sévère	Sévère	Sévère
Marche indépendante	7 ans	8 ans	8 ans
Retard de langage	+	+	+
Périmètre crânien	54 cm	/	51 cm (-2 SD)
Taille	148 cm (-2 SD)	154 cm (<-2SD)	130 cm (-2SD)
Poids	57 kg	50 kg	30 kg
Diabète insipide	+	+	+
Vision	Normale	Normale	Normale
Audition	Normale	Normale	Normale
Crise d'épilepsie	-	-	-

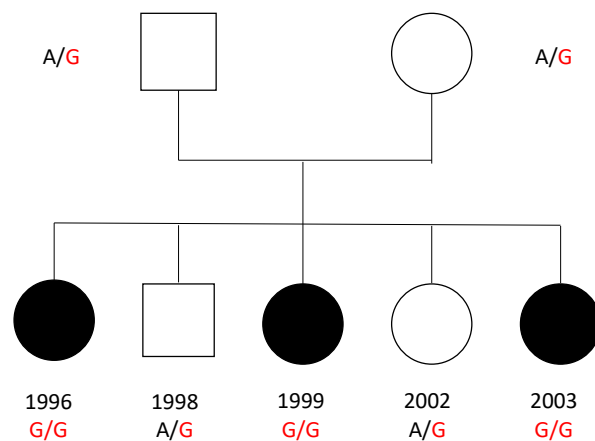


Figure 2 : Arbre généalogique de la famille atteinte de la mutation du gène CELSR3. Les deux parents possèdent la mutation (G) de manière hétérozygote et c'est aussi le cas pour deux de leurs cinq enfants. Cependant, trois d'entre eux possèdent cette même mutation de manière homozygote.

Comme on peut le voir dans le tableau 1, les patientes souffrent de diabète insipide qui se caractérise par une polyurie et par une sensation de soif exacerbée. Cependant, les patientes ont des taux de glucose sanguin normaux. Le mécanisme physiopathologique de cette maladie consiste en l'incapacité du rein de retenir l'eau dans l'organisme. Dans le diabète insipide central, le déséquilibre des fluides peut être causé par un déficit en hormone antidiurétique (ADH), aussi appelée vasopressine (AVP), par un défaut des précurseurs de la synthèse de ADH, ou par une malformation de l'hypothalamus, tandis que le diabète insipide néphrogénique est surtout dû à l'incapacité du rein à répondre à l'ADH (Robertson 2016). En effet, la vasopressine est synthétisée dans l'hypothalamus, plus précisément dans les neurones magnocellulaires situés dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires. Ensuite, ce neuropeptide est sécrété dans la circulation générale par la glande pituitaire postérieure, connue sous le nom de la neurohypophyse (Figure 3), afin de jouer son rôle homéostatique grâce à son action sur le rein (Baribeau and Anagnostou 2015).

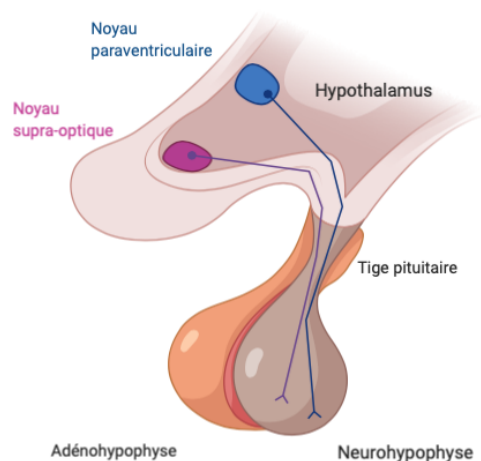


Figure 3 : Axe hypothalamo-hypophysaire. Les noyaux paraventriculaires et supra-optiques de l'hypothalamus produisent l'ADH qui est ensuite transportée par la tige pituitaire jusqu'à la neurohypophyse ou elle sera sécrétée.

Outre son rôle de contrôle de l'homéostasie, l'hypothalamus régule aussi la reproduction, la température corporelle, la croissance, le rythme circadien, les réponses d'urgence ainsi que les dépenses énergétiques comprenant entre-autres le contrôle de la faim. En effet, le noyau arqué situé à la base de l'hypothalamus, contient les neurones POMC (proopiomélanocortine) et AgRP (Agouti-Related Peptide) qui induisent respectivement un sentiment de satiété ou de faim. L'insuline produite par le pancréas, la leptine produite par les tissus adipeux et la ghréline

produite par l'estomac, agissent toutes directement sur ces neurones. Tandis que la cholécystokinine produite par le petit intestin agit indirectement sur ces neurones via le nerf vague et le noyau de tractus solitaire. La leptine et l'insuline sont toutes les deux le reflet de l'état nutritionnel du corps à long terme, cependant, la leptine induit la satiété tandis que l'insuline induit la faim. Quant à la ghréline et la cholécystokinine, elles sont le reflet à court terme de l'état nutritionnel du système gastro-intestinal, la ghréline induisant un sentiment de faim et la cholécystokinine, un sentiment de satiété (Luo 2015).

L'hypothalamus est complexe fonctionnellement, comme décrit ci-dessus mais aussi anatomiquement. Dans la plus grande partie du système nerveux central, comme le cortex, le cervelet, ou la moelle épinière, les neurones ayant une même fonction sont organisés en colonnes ou en couches. En revanche, l'hypothalamus est composé de noyaux ou d'aires arrangées en patchwork autour du troisième ventricule. La structure tridimensionnelle unique de l'hypothalamus est due entre-autres à l'éminence médiane et à la neurohypophyse composé de cellules gliales spécialisées appelées tanocytes et pituicytes. Avec d'autres composantes, ces cellules forment l'interface sang-cerveau permettant la communication entre le corps et l'hypothalamus. La majorité des neurones hypothalamiques et des cellules gliales sont originaires de cellules progénitrices localisées dans la partie ventrale du cerveau antérieur en développement. Suite à un ensemble de signaux chimiques définis dans le temps et l'espace, ces progéniteurs donnent des progéniteurs antérieurs, des progéniteurs mammillaires et l'infundibulum qui est une petite structure vitale composée de progéniteurs gliaux qui vont pousser ventralement comme l'éminence médiane et la neurohypophyse afin de rejoindre l'adénohypophyse (Wray and Blackshaw 2020).

L'hypophyse contrairement au reste du cerveau possède deux origines embryonnaires, une partie provient du neuro-ectoderme tandis que l'autre vient de l'ectoderme oral. La première partie va donner la neurohypophyse qui est postérieure et la seconde donnera l'adénohypophyse, plus antérieure. L'adénohypophyse ne communique pas directement avec l'hypothalamus. En effet, une première hormone est produite par l'hypothalamus et elle sera sécrétée dans le système porte hypophysaire. Cette hormone va alors rejoindre l'adénohypophyse par des vaisseaux sanguins et une fois arrivée dans l'adénohypophyse, elle induira la production d'une seconde hormone qui sera elle sécrétée dans la circulation générale. Contrairement à l'adénohypophyse, la neurohypophyse reçoit directement les projections axonales de certains noyaux hypothalamiques tels que le noyau supra-optique et le noyau paraventriculaire comme décrit dans la Figure 3. Les hormones sont alors sécrétées dans la

circulation générale au niveau de la neurohypophyse. C'est le cas de l'ADH comme déjà précisé plus haut.

L'objectif de mon mémoire est d'étudier les conséquences de la mutation humaine de *CELSR3* chez des souris génétiquement modifiées. Plus précisément, nous allons étudier ces souris sur le plan histologique, comportemental et métabolique pour mieux comprendre le lien entre la mutation de *CELSR3*, les troubles cognitifs, le diabète insipide mais aussi les possibles différences de poids entre des souris contrôles et des souris possédant la mutation humaine. Pour ce faire, une analyse histologique et immuno-histologique de l'axe hypothalamo-hypophysaire sera réalisée, ainsi que différents tests cognitifs et métaboliques.

Matériel et méthodes :

Création des modèles animaux :

- Celsr3 KI/KI:

Afin de créer des souris possédant la mutation humaine A9355G de *CELSR3*, la technique CRISPR/Cas9 a été utilisée par mon laboratoire d'accueil (Figure 4). En effet, un plasmide contenant le vecteur modèle et CRISPR/Cas9 a été introduit dans plusieurs zygotes de souris C57BL/6 par micro-injection. Ensuite, les zygotes furent réintroduits dans l'utérus d'une femelle pseudo-gestante. Des souris possédant au moins un allèle muté ont été sélectionnées et croisées avec des souris sauvages (C57BL/6). Les souris hétérozygotes pour la mutation ainsi obtenues ont été rétro-croisées à plusieurs reprises afin d'éliminer toute mutation hors cible causée par CRISPR/Cas9. Enfin, pour obtenir des animaux homozygotes pour la mutation, des hétérozygotes ont été accouplés, ce qui nous donne des hétérozygotes, des formes sauvages (qui serviront de contrôle négatif) et des souris homozygotes.

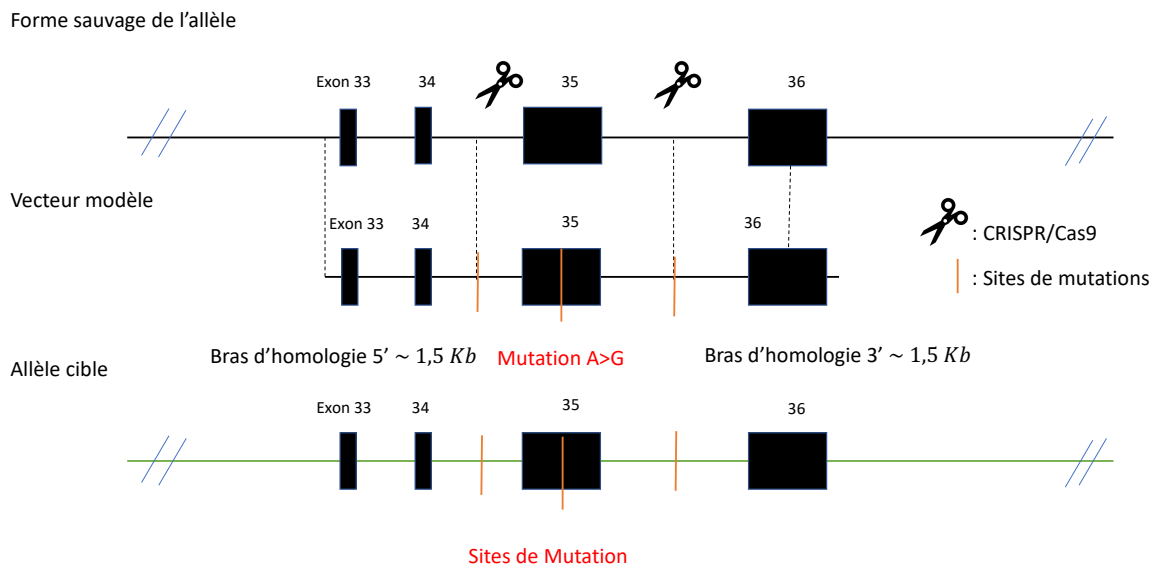


Figure 4 : Construction qui permet l'insertion d'une mutation dans le gène *Celsr3* murin grâce à la technologie CRISPR/Cas 9. Le vecteur possède deux bras d'homologies d'environ 1,5 Kb et la mutation souhaitée. Il sert de modèle pour réparer l'allèle sauvage de *Celsr3* suite à la coupure de CRISPR/Cas9 dans le génome. Et cette réparation se traduit par la substitution d'une sérine en glycine dans l'exon 35 du gène.

En plus des souris *Celsr3* KI/KI, deux autres types de souris sont utilisées dans ce projet et servent de contrôles afin d'étudier le développement et le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire en absence totale de *Celsr3* ou si cette protéine est seulement absente du télencéphale. Ces deux modèles sont décrits ci-dessous.

- *Celsr3* KO :

Afin de créer des souris KO pour le gène *Celsr3*, les exons 19 à 27 ont été délétés grâce à une Cré recombinase (Figure 5), qui est sous le contrôle d'un promoteur fort et ubiquiste, *PGK*. Ce promoteur permet d'exprimer la Cré recombinase dans le zygote fécondé. Lorsque les exons 19 à 27 sont délétés, la protéine ne peut plus s'insérer dans la membrane plasmique de la cellule et est dégradée (Tissir, Bar et al. 2005).

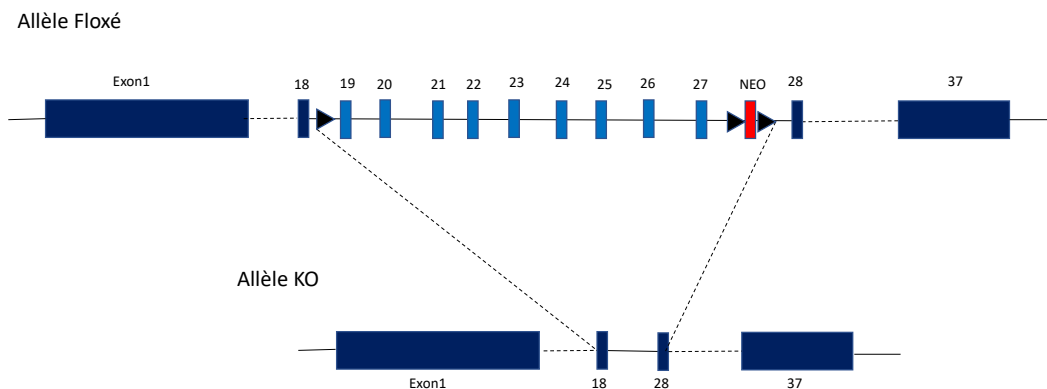


Figure 5 : Construction pour la délétion de l'exon 19 à 27 du gène *Celsr3* murin. Les flèches noires représentent des séquences flox tandis que le carré rouge représente le gène qui code la néomycine, qui est toxique pour les bactéries. Lorsque le gène *Celsr3* est KO, la séquence entre les deux séquences LoxP les plus éloignées est délétée grâce à une Cré recombinase. Théoriquement, cette excision empêcherait la protéine de s'insérer dans la membrane plasmique et d'ainsi jouer son rôle physiologique. Une analyse par Western blot n'a pas détecté de protéine résiduelle, indiquant une instabilité de la protéine mutée.

- *Celsr3^{Foxg1 cKO}*.

Pour créer des souris où le gène *Celsr3* serait KO dans l'adénohypophyse et dans le télencéphale, la même technique que pour les souris KO total a été utilisée, sauf que la Cre recombinase est sous le contrôle du promoteur *Foxg1* qui permet d'exprimer la Cre recombinase dans l'adénohypophyse et dans le télencéphale. En effet, en croisant des femelles possédant le gène *Celsr3* floxé avec des mâles possédant *Celsr3^{+/-} ; Foxg1 Cre*, il est possible d'obtenir des jeunes où *Celsr3* sera délété dans une partie de l'axe hypothalamo-hypophysaire et dans le prosencéphale (Zhou, Bar et al. 2008). Les mutants sont alors les souris *Celsr3^{f/-} ; Foxg1Cre⁺* tandis que les contrôles sont les animaux *Celsr3^{f/+} ; Foxg1 Cre⁺*.

Tests cognitifs :

- *Open Field*:

L'Open Field est un test comportemental permettant d'étudier la locomotion spontanée, l'anxiété et la mémoire chez les souris (Jacqueline N. Crawley 2007). Durant ce test, les souris sont placées dans un nouvel environnement, qui est ici une caisse en plexiglas (Figure 6), leurs déplacements sont enregistrés par une caméra couplée à un programme qui va analyser les mouvements. Ce test permet aussi d'apprécier l'anxiété. En effet, une souris normale passe plus de temps en périphérie qui est plus sombre et moins anxiogène. Ensuite, afin d'analyser la mémoire, la souris est remise dans ce même environnement 24 heures plus tard. Si elle a gardé l'environnement en mémoire, elle l'explorera moins la seconde fois. L'analyse des vidéos est faite grâce au logiciel EthoVision (Noldus, Pays-Bas).

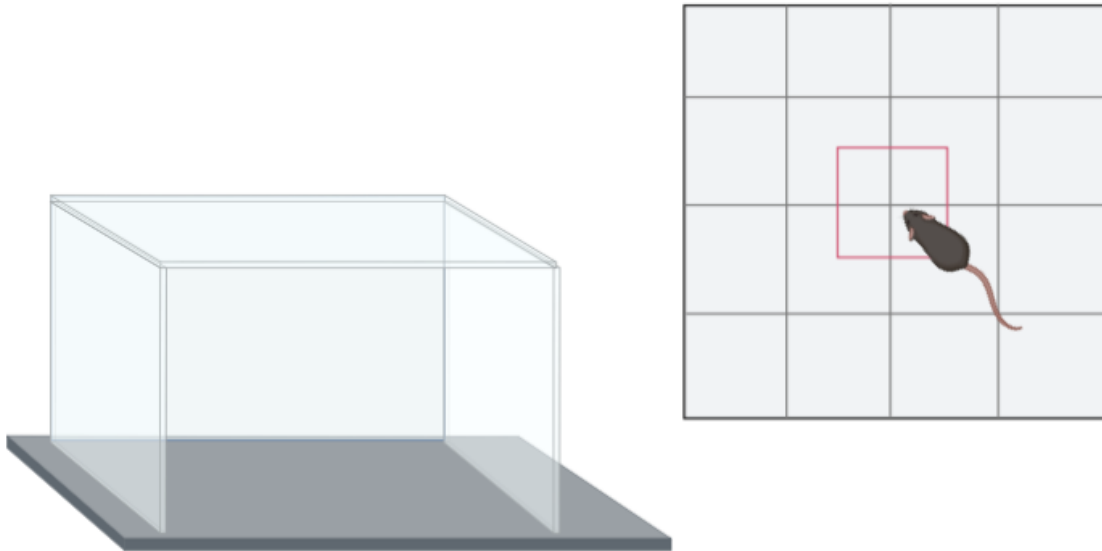


Figure 6 : Dispositif de l'open field en plexiglas et vue de haut du dispositif. Le carré rouge représente le centre de l'open field. C'est à cet endroit que se dirige l'animal s'il n'est pas stressé. L'image a été réalisée avec Biorender.

- Labyrinthe en Y :

Le labyrinthe en Y est un test qui permet d'étudier la mémoire de travail chez les souris (Jacqueline N. Crawley 2007). Ce test se base sur l'exploration spontanée des souris lorsqu'elles sont dans un nouvel environnement. Ce labyrinthe se compose de 3 bras de longueur identique en PVC qui forment un angle de 120° entre eux. Après une habitude de 15 minutes, la souris est placée dans le bras Start (A) et elle a accès aux deux autres bras, le bras familier (B) et le bras nouveau (C) (Figure 7). La souris peut se balader pendant 5 minutes durant lesquelles, elle est traquée par vidéo. Ces vidéos seront analysées par le logiciel EthoVision (Noldus, Pays-Bas).

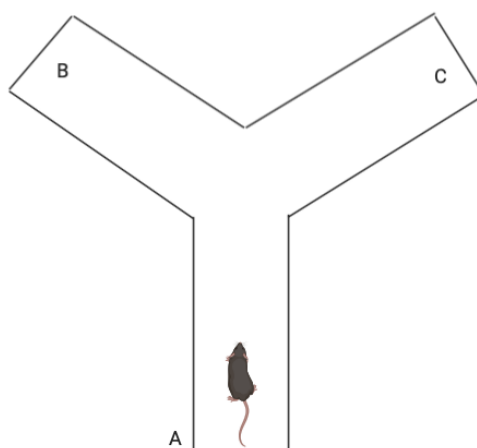


Figure 7 : Labyrinthe en Y. Bras A = Bras de départ, bras B = bras familier et bras C = nouveau bras. L'image a été réalisée avec Biorender.

- Piscine de Morris :

La piscine de Morris est un test qui permet d'étudier la mémoire spatiale et l'apprentissage de la souris (Jacqueline N. Crawley 2007). La piscine divisée en quatre quadrants virtuels (Nord, Sud, Ouest, Est) est remplie d'eau chauffée à 26°C contenant des pigments blancs de craie afin de rendre l'eau opaque (Figure 8). Plusieurs repères visuels sont placés tout autour de la piscine. Tout d'abord, il y a une phase de 15 minutes afin d'habituer la souris au local. Ensuite débute la phase d'entraînement durant laquelle une plateforme est visible à la surface de l'eau et la souris est placée dans la piscine durant 1 minute maximum (jour T). Une fois elle est placée au sud, puis à l'ouest et enfin au nord. Ensuite, le lendemain, les phases de tests sur 3 jours commencent. Durant cette phase, la plateforme se trouve sous l'eau et est donc invisible pour la souris. Chaque jour, la souris est mise deux fois dans la piscine à 4 heures d'intervalle et à des endroits différents. Et durant toutes ces phases, la souris est traquée grâce à une caméra dont les vidéos seront analysées par le logiciel « Noldus EthoVision » grâce auquel, la mémoire de la souris est évaluée. Pour cela, la vitesse à laquelle la souris trouve la plateforme est mesurée à chaque phase du test. Enfin, le jour 5, les animaux effectuent le « Probe Test » qui consiste à permettre à l'animal de nager librement dans la piscine sans qu'il y ait de plateforme. Grâce à ce test, le temps passé dans chaque quadrant de la piscine est mesuré, permettant d'évaluer la mémoire de rétention. Si la souris se souvient bien, elle aura tendance à passer plus de temps dans le quadrant où se trouvait la plateforme auparavant.

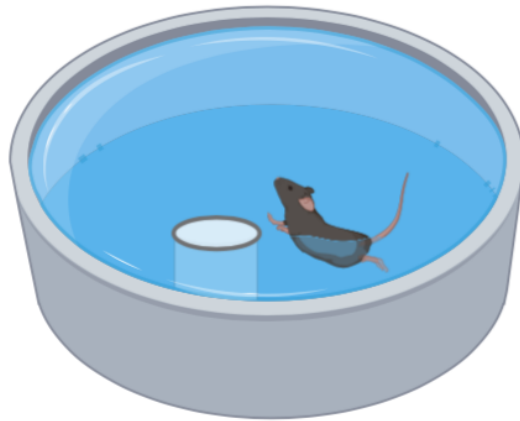


Figure 8 : Piscine de Morris avec une plateforme. L'image a été réalisée avec Biorender.

Tests métaboliques :

- **Physio-cages :**

Les physio-cages, aussi appelées les cages métaboliques, sont utilisées afin de mesurer la quantité de nourriture et d'eau que consomme une souris (Jacqueline N. Crawley 2007). Ces cages peuvent aussi enregistrer la distance parcourue par la souris durant l'expérimentation ainsi que le nombre de fois qu'elle se redresse grâce à la coupure d'un laser. Après que les souris aient été habituées à l'environnement durant 24 heures, toutes les données sont récoltées sur une période de 48 heures. Ensuite, celles-ci sont analysées avec le programme « Metabolism de BIOSEB ».

- **Mesures de poids :**

Afin de voir si la mutation insérée dans le gène *Celsr3* cause des variations dans la croissance des souris comme c'est le cas chez l'homme, les animaux *Celsr3* KI/KI et WT sont pesés dès que l'on possède le génotype de ces souris et ensuite, le poids est mesuré une fois par semaine. Les résultats ainsi obtenus sont comparés au sein des animaux de même sexe mais aussi au sein des fratries.

- Mesures urinaires:

Afin de mesurer le volume, ainsi que l'osmolarité de l'urine produite par les souris mâles, celles-ci sont placées plusieurs fois dans des cages permettant de récolter l'urine afin de les habituer aux cages et que le volume urinaire produit devienne constant. Une fois que la phase d'habituation est terminée, les souris sont placées dans les cages 3 X 24h sans accès à la nourriture afin de récolter l'urine en condition « normale ». Puis elles sont une nouvelle fois placées dans ces cages durant 24h mais cette fois-ci sans avoir accès ni à la nourriture, ni à l'eau afin d'exacerber les symptômes du possible diabète insipide. Suite à cela, le volume urinaire produit sur 24h est mesuré en pesant l'urine. Tandis que l'osmolarité urinaire est mesurée grâce à un osmomètre (Fiske one-ten Osmometer).

- Récolte de sang et préparation :

Afin de quantifier le taux d'hormones du circuit de la faim (Insuline, Leptine, Ghréline, Cholécystokinine), du sang de souris est prélevé dans la queue et est placé dans un tube héparine avant d'être centrifugé durant 10 minutes à 2000 G à 4°C ou durant 15 minutes à 1600 G à 4°C en présence d'aprotinin, un inhibiteur de protéase (RK-APRO, Phoenix Pharmaceuticals) pour la cholécystokinine et la ghréline. Pour la leptine, le plasma est dilué 10 fois dans du Sample Diluent NS (ab199082, Abcam), tandis que la ghréline doit être diluée 10 fois dans du tampon présent dans le kit Elisa (EK-031-31, Phoenix Pharmaceuticals). Quant à la cholécystokinine, elle doit d'abord être extraite du plasma avant de pouvoir la quantifier. Pour se faire, le plasma est acidifié grâce à un volume identique de tampon A (RK-BA-1, Phoenix Pharmaceuticals) et centrifugé de 6000 à 17000 G pendant 20 minutes à 4°C. Tout d'abord, la colonne (RK-SEPCOL-1, Phoenix Pharmaceuticals) est lavée avec 1 ml de tampon B (RK-BB-1, Phoenix Pharmaceuticals) puis avec 3X3 ml de tampon A et ensuite, le plasma est mis sur la colonne qui est une nouvelle fois lavée avec 2X3 ml de tampon A. Enfin, la colonne est éluée avec 3 ml de tampon B et le peptide est récupéré et séché avant d'être dilué 2 fois dans du tampon (EK-069-04, Phoenix Pharmaceuticals).

- Elisa Leptine :

Afin de mesurer la quantité de leptine plasmatique, un Elisa sandwich leptine (Figure 9) est réalisé (ab199082, Abcam). Le principe est le suivant, un anticorps de capture est accroché au fond de chaque puits et permet de capturer l'antigène d'intérêt. Ensuite, un anticorps primaire

va lui aussi lier l'antigène d'intérêt et sera reconnu par l'anticorps secondaire relié à une enzyme capable de transformer un substrat en produit coloré ou luminescent qui sera proportionnel à la quantité d'antigène présent dans chaque puit. Pour se faire, tout d'abord, 50 μl de standard (6000 pg/ml; 3000 pg/ml; 1500 pg/ml; 750 pg/ml; 375 pg/ml; 187,5 pg/ml; 93,75 pg/ml; 0 pg/ml) ou d'échantillons dilués 10 fois sont mis dans chaque puits aussi que 50 μl de cocktail d'anticorps contenant des anticorps de captures et de détections. La plaque est alors agitée à 400 rpm durant une heure à température ambiante afin que la leptine présente dans les échantillons et les standards se lient aux anticorps qui sont attachés à la plaque et qu'ensuite, les anticorps de capture et de détection se lient à leur tour à la leptine capturée. Après cela, chaque puit est lavé 3 fois avec 350 μl de tampon de lavage afin d'éliminer toutes les substances qui ne se sont pas liées aux anticorps attachés à la plaque. Ensuite, afin de quantifier la quantité de leptine qui a été capturée par les anticorps, 100 μl de TMB Development Solution sont ajoutés par puit et on laisse la plaque reposer durant 10 minutes dans le noir à 400rpm. La solution TMB en contact d'enzymes présentes sur les anticorps de détection, va permettre de produire un substrat coloré proportionnellement à la quantité de leptine présente dans chaque puit. Par la suite, la réaction de révélation est stoppée par l'ajout de 100 μl de Stop Solution par puit avec agitation durant 1 minute et l'absorbance est mesurée à 450 nm grâce à un spectrophotomètre SpectraMax M3. Enfin, à partir de la droite d'étalonnage, une droite de régression est déterminée et une équation de droite est calculée grâce à Excel. Cette équation permet de calculer la concentration réelle en leptine dans le sang à partir de l'absorbance mesurée pour chaque puit.

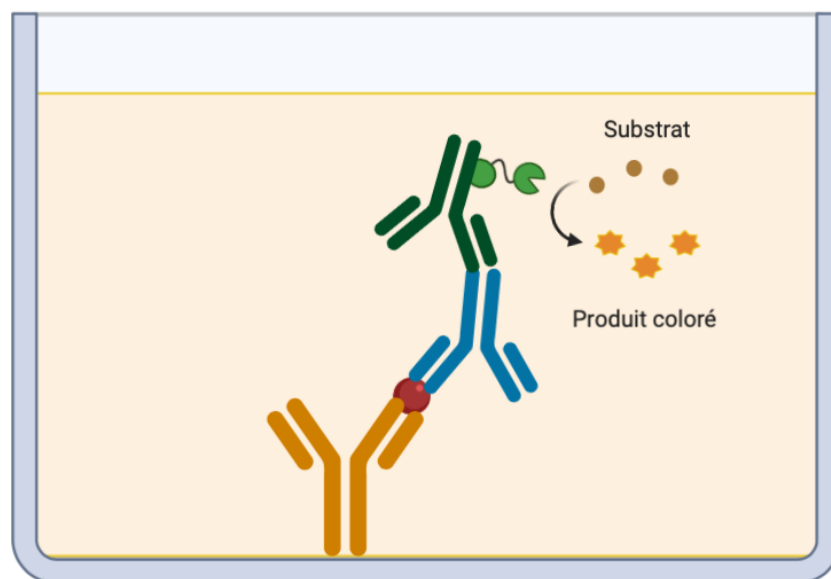


Figure 9: Elisa Sandwich. Un anticorps est attaché au fond d'un puit et permet d'immobiliser la protéine d'intérêt à laquelle va se lier un second anticorps (anticorps de capture) lui-même lié à un troisième anticorps (anticorps de détection) sur lequel est attaché une enzyme qui en présence de son substrat produira un produit coloré ou luminescent détectable et quantifiable. L'image a été réalisée avec Biorender

- Elisa Insuline :

Afin de mesurer la quantité d'insuline plasmatique, un Elisa sandwich insuline (Figure 9) est réalisé (#90080, Crystal Chem). Le principe est le suivant, un anticorps de capture est accroché au fond de chaque puit et permet de capturer l'antigène d'intérêt. Ensuite, un anticorps primaire va lui aussi se lier à l'antigène d'intérêt et sera reconnu par l'anticorps secondaire relié à une enzyme capable de transformer un substrat en produit coloré ou luminescent qui sera proportionnel à la quantité d'antigène présent dans chaque puit. Pour se faire, tout d'abord, 5 μ l de standard (12,8 ng/ml ; 6,4 ng/ml ; 3,2 ng/ml ; 1,6 ng/ml ; 0,8 ng/ml ; 0,4 ng/ml ; 0,2 ng/ml ; 0,1 ng/ml ; 0 ng/ml) ou d'échantillons sont mis dans chaque puit aussi que 95 μ l de Sample Diluent. La plaque est alors laissée durant deux heures à 4°C afin que l'insuline présente dans les échantillons et les standards se lient aux anticorps qui sont attachés à la plaque. Après cela, chaque puit est lavé 5 fois avec 300 μ l de tampon de lavage afin d'éliminer toutes les substances qui ne se sont pas liées aux anticorps attachés à la plaque. Ensuite, 100 μ l d'anticorps anti-insuline conjugués à une enzyme sont ajoutés par puit et incubent durant 30 minutes à température ambiante afin les anticorps se lient à leur tour à l'insuline capturée. Par la suite, chaque puit est lavé 7 fois avec 300 μ l de tampon de lavage afin d'éliminer tous les anticorps qui ne se sont pas liés à l'insuline et 100 μ l de solution contenant un substrat enzymatique est ajoutée et mise durant 40 minutes dans le noir. Une fois le substrat enzymatique en contact d'enzymes présentes sur les anticorps de détection, un substrat coloré sera produit proportionnellement à la quantité d'insuline présente dans chaque puit. Par la suite, la réaction de révélation est stoppée par l'ajout de 100 μ l d'Enzyme Reaction Stop Solution par puit et ainsi l'absorbance peut être mesurée à 450 nm et à 630 nm grâce à un spectrophotomètre SpectraMax M3. Enfin, à partir de la droite d'étalonnage, une droite de régression est déterminée et une équation de droite est calculée grâce à Excel. Cette équation permet de calculer la concentration réelle en insuline dans le sang à partir de l'absorbance mesurée pour chaque puit.

- Elisa Cholécystokinine et Ghréline :

Afin de mesurer la quantité de cholécystokinine et de ghréline plasmatique, un Elisa sandwich cholécystokinine et un Elisa sandwich ghréline (Figure 9) sont réalisés (EK-069-04, Phoenix Pharmaceuticals et EK-031-31, Phoenix Pharmaceuticals). Le principe est le suivant, un anticorps de capture est accroché au fond de chaque puit et permet de capturer l'antigène d'intérêt. Ensuite, un anticorps primaire va lui aussi se lier à l'antigène d'intérêt et sera reconnu par l'anticorps secondaire relié à une enzyme capable de transformer un substrat en produit coloré ou luminescent qui sera proportionnel à la quantité d'antigène présent dans chaque puit. Pour se faire, tout d'abord, 50 μl de standard (100 ng/ml ; 10 ng/ml ; 1 ng/ml ; 0,1 ng/ml ; 0,01 ng/ml), ou de tampon ou de contrôle positif ou encore d'échantillons sont mis dans chaque puit. Ensuite, 25 μl d'anticorps anti-cholécystokinine ainsi que 25 μl de peptide biotinylé sont ajoutés par puit et incubent durant 2 heures à température ambiante et à agitation constante afin les anticorps se lient à leur tour à la cholécystokinine capturée. Par la suite, chaque puit est lavé 4 fois avec 350 μl de tampon afin d'éliminer tous les anticorps qui ne se sont pas liés à la cholécystokinine et 100 μl de SA-HRP (Stréptavidine peroxydase) sont ajoutés durant 1 heure. Ensuite, chaque puit est une nouvelle fois lavé 4 fois avec 350 μl de tampon afin d'éliminer toutes les enzymes qui ne se seraient pas liés. Et 100 μl de TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) sont mis par puit à l'abri de la lumière durant 1 heure. Une fois le substrat enzymatique en contact d'enzymes présentes sur les anticorps de détection, un substrat coloré sera produit proportionnellement à la quantité d'insuline présente dans chaque puit. Par la suite, la réaction de révélation est stoppée par l'ajout de 100 μl de 2NHCl par puit et ainsi l'absorbance peut être mesurée à 450 nm grâce à un spectrophotomètre SpectraMax M3. Enfin, à partir de la droite d'étalonnage, une droite de régression est déterminée et une équation de droite est calculée grâce à Excel. Cette équation permet de calculer la concentration réelle en cholécystokinine dans le sang à partir de l'absorbance mesurée pour chaque puit.

Histologie :

- Fixation et décalcification:

- Celsr3 KI/KI:

Afin de récupérer des têtes pour l'analyse histologique, des animaux adultes sont anesthésiés et perfusés avec de la para-formaldéhyde (PFA) 4%. La tête est récupérée et la partie du dessus du crâne est enlevée (mais pas le dessous de la boîte crânienne afin de ne pas abimer la tige pituitaire). Elle est placée 24 heures dans le Bouin ou dans la PFA puis 2 jours dans l'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) 25% afin de décalcifier l'os. Après décalcification, les têtes sont rincées 3 fois durant 15 minutes au tampon phosphate salin (PBS) 1X sur rouleau.

- Celsr3 KO :

Afin de récupérer des têtes pour l'analyse histologique, des cerveaux des animaux dont le gène *Celsr3* est totalement délété, sont récupérés suite à la décapitation de l'animal au jour postnatal 0 car la mutation conduit à une défaillance ventilatoire qui cause la mort de l'animal dès les premières heures de vie de celui-ci (Tissir, Bar et al. 2005). Après la décapitation, le crâne est récupéré et sera incisé au niveau de la suture sagittale pour une meilleure fixation au Bouin ou dans la PFA qui durera 24 heures. Après avoir été fixés, les crânes sont rincés 3 fois durant 15 minutes avec PBS 1X et ce sur rouleau.

- Celsr3^{Foxg1 cKO} :

Tout comme pour les *Celsr3* KI/KI, les cerveaux des animaux dont le gène *Celsr3* est délété dans le télencéphale et de l'adénohypophyse, sont récupérés suite à la fixation sur animal vivant avec de la PFA 4% de l'animal au jour postnatal 15 car la mutation conduit à la mort des jeunes assez tôt (avant le jour postnatal 21) (Zhou, Bar et al. 2008). Ensuite, le crâne est récupéré et la partie du dessus du crâne est enlevée mais pas le dessous afin de ne pas abimer la tige pituitaire. Le crâne ainsi ouvert est placé 24 heures dans le Bouin ou dans la PFA puis 2 jours dans l'EDTA 25% afin de décalcifier l'os. Après avoir été décalcifiés, les crânes sont rincés 3 fois durant 15 minutes au PBS 1X sur rouleau.

- Enrobage en OCT et coupe au cryostat:

Tous les cerveaux récupérés et fixés, sont enrobés d'OCT afin de réaliser des coupes histologiques. Pour la cryopréservation, les cerveaux sont placés dans des concentrations croissantes de sucrose (10%, 20%, 30%) durant 24h à 4°C. Ensuite, les cerveaux sont mis dans un mélange moitié O.C.T. (CA 90248, Sciger Scientific Gardena) et moitié sucrose 30% et laissés 30 minutes à température ambiante et à agitation constante. Par la suite, les échantillons sont placés dans une cupule selon l'orientation de coupe souhaitée (ici sagittale et coronale) et recouverts d'O.C.T. avant de reposer 1 à 2 heures. Suite à quoi les cupules sont déposées durant 20 minutes sur des blocs métalliques placés dans l'azote liquide afin d'effectuer des coupes de 20 µm au cryostat. Les coupes ainsi obtenues sont mises sur lames.

- Coloration à l'Hématoxyline-Éosine :

Afin d'observer l'histologie générale de la tige pituitaire, une coloration à l'Hématoxyline-Éosine est réalisée. Son principe est le suivant, l'hématoxyline est un colorant nucléaire tandis que l'éosine est un colorant cytoplasmique qui donne une couleur rose au cytoplasme et aux autres composantes cellulaires basiques mais colore en rose/rouge les composantes acidophiles de manière plus ou moins vive selon leur acidophilie. Pour se faire, tout d'abord, les coupes sont déshydratées grâce à un passage dans un bain d'Isopropanol 50% pendant une minute et de 2 bains d'Isopropanol 100% pendant une minute. Ensuite, les précipités de fixation sont éliminés grâce à un passage durant 5 minutes dans de l'alcool ammoniacé et d'un passage durant 1 minute dans de l'isopropanol 50% cette fois-ci. Après cela, les échantillons sont réhydratés durant 5 minutes dans de l'eau. Afin de colorer les lames à l'Hématoxyline, celles-ci sont trempées durant 3 minutes dans de l'Hématoxyline avant d'être rincées 12 minutes à l'eau et afin de colorer les lames à l'Éosine, celles-ci sont trempées très rapidement dans l'éosine avant d'être à nouveau rincées à l'eau durant 2 minutes. Enfin, les coupes sont une nouvelle fois déshydratées grâce à un passage successif et bref dans l'isopropanol 50% puis 100% (X2). Enfin, les lames pourront être montées suite à 3 passages de 3 minutes dans du Toluène.

- Marquage immuno-histochimique des neurofilaments :

Après cela, nous souhaiterions observer les neurofilaments qui sont des protéines du cytosquelette principalement présentes dans les axones des neurones. C'est pourquoi nous allons réaliser un immuno-marquage des neurofilaments. Cette technique est basée sur le principe qu'un antigène peut être reconnu par un anticorps qui est lui-même l'antigène d'un second anticorps marqué, soit par fluorescence soit par un agent chromatique. Pour commencer, les lames sont rincées à l'eau et au PBS. Afin d'inactiver les peroxydases endogènes, les lames seront incubées 5 minutes avec du PBS + 3 % H₂O₂. Ensuite, les lames sont rincées 5 minutes dans du PBS avec 0,1% de Triton X-100 (PBST), ce qui permet de perméabiliser le tissu. Par la suite, les sites de liaison aspécifique de l'anticorps sont bloqués durant 30 minutes grâce à une solution de PBST + 3% de sérum de cheval (HS). L'anticorps primaire anti-neurofilament (Neurofilament 2H3, AB2314897, DSHB) est dilué 2/500 fois dans du PBST et 1,5% de HS, cette solution est mise sur lame qui sera incubée durant une nuit à 4°C. Afin d'enlever tout anticorps qui ne se serait pas lié à un antigène, les lames sont rincées 3 X au PBST. Ensuite, les lames seront incubées avec du PBST et 5 % d'anticorps secondaire Biotinylé (PK-8800, Vector) et ce durant 10 minutes avant d'être rincées 3X 5 minutes avec du PBST. Après cela, les lames sont incubées avec une solution contenant 2,5 % de Streptavidine (PK-8800, Vector) et 2,5 % de peroxydase de raifort Biotinylé (PK-8800, Vector) dans du PBST durant environ 5 minutes avant d'être rincées 2 fois durant 5 minutes avec du PBST et 1 fois 5 minutes avec du Tris-HCl 0,1 M pH 7,6. Les anticorps sont alors révélés avec DAB. Pour cela, il faut dissoudre une pastille de DAB (D5905, Sigma) durant 5 minutes dans 15 ml de PBS et vortexer le mélange à l'abri de la lumière avant de le filtrer. 2 ml de cette solution seront ajoutés à 3µl de H₂O₂ 30% et le volume sera ramené à 10 ml. Le tout sera déposé sur lame durant 10 minutes dans le noir. Enfin, les lames sont rincées avec du PBS et de l'eau avant d'être colorées à l'Éosine comme décrit ci-dessus et montées.

- Marquage immuno-fluorescent de l'ADH :

Ensuite, nous voudrions localiser la vasopressine (ADH) qui est une protéine produite par l'hypothalamus et ensuite stockée dans des axones présents au niveau de la neurohypophyse (Baribeau and Anagnostou 2015). C'est pourquoi nous allons réaliser un immuno-marquage de la vasopressine. Cette technique est basée sur le principe qu'un antigène peut être reconnu par un anticorps qui est lui-même l'antigène d'un second anticorps marqué, soit par fluorescence

soit par un agent chromatique. Pour commencer, les cerveaux sont réhydratés grâce à un passage de 10 minutes dans de l'eau à 37°C avant d'être rincés avec 0,1% de Triton X-100 (PBST) durant 5 minutes. Après cela, une barrière est créée autour des échantillons grâce au stylo hydrophobique DAKOPen. Ensuite, les coupes sont bloquées afin d'éviter que les anticorps ne restent coincés sur le tissu sans s'être liés à son antigène. Pour ce faire, on recouvre les tissus de tampon de blocage contenant 3% de sérum de chèvre, 1 % d'albumine de sérum bovin et du PBST afin de mettre à volume. Après cela, un anticorps anti-ADH (ab39363, Abcam) est dilué 500 fois dans le tampon de blocage avant d'être mis sur coupe durant une nuit à 4°C dans une boîte humide. Par la suite, les lames sont rincées 3 fois durant 5 minutes avec du PBST afin d'éliminer les anticorps qui ne se seraient pas liés à l'ADH et l'anticorps secondaire (A21206, Invitrogen, dilution 1/500) est ajouté sur les coupes durant 2h à température ambiante avant d'être une nouvelle fois rincées 2 fois durant 5 minutes dans du PBST et 1 fois 5 minutes dans du PBS. Enfin, afin de marquer les noyaux, les lames sont incubées durant 5 minutes avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, D9564, Sigma) dilué 1000 fois dans du PBS avant d'être rincées 3 fois durant 5 minutes dans du PBS et d'être montées comme décrits-ci-dessus.

- Hybridation in-situ (RNAscope) :

Enfin, nous voudrions vérifier que *Celsr3* est bien exprimé au niveau de l'axe hypothalamo-hypophysaire au cours du développement (E14 et P0). Afin de vérifier cela, nous allons utiliser le RNAscope qui consiste à localiser sur coupe une séquence nucléotidique connue mono-brin grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques entre elles. Mais contrairement à l'hybridation in-situ dont il s'inspire, le RNAscope utilise deux sondes qui seront ensuite détectées par une troisième sonde nucléotidique sur laquelle se lieront différentes molécules fluorescentes ou chromogènes. Dans le but de réaliser cette technique, les cerveaux de souris CD1 (cluster de différenciation, utilisés comme contrôle ici) sont récupérés au jour embryonnaire 14 (E14) et au jour postnatal 0 (P0) comme expliqué plus haut pour les souris *Celsr3* KO excepté que tous les produits utilisés doivent être sans RNase (RF). Ensuite, les cerveaux sont cryo-préservés puis enrobés en OCTRF avant d'être coupé au cryostat. Les coupes réalisées au cryostat dans des conditions sans la présence de RNase sont séchées à 60°C durant 30minutes puis lavées 5 minutes au PBS et refixées durant 15 minutes à 4°C grâce à la PFA. Ensuite, afin de déshydrater les tissus, ces derniers sont incubés durant 5 minutes dans de l'éthanol 50 %, puis dans de l'éthanol 70% et enfin 2 X 5 minutes dans l'éthanol 100% avant

d'être mis à sécher sous la hotte. Après cela, une barrière est créée autour des échantillons grâce au stylo hydrophobique Immedge. Par la suite, les tissus sont perméabilisés en ajoutant du peroxyde d'hydrogène durant 10 minutes sur les coupes qui sont lavées à l'eau durant 5 minutes avant d'ajouter la Protéinase IV (322336, ACD) durant 30 minutes (pour les embryons, la Protéinase Plus (322331, ACD) est utilisée et l'échantillon est incubé dans le four HybEZ durant 30 minutes à 40°C) et les coupes sont lavées 2 fois durant 5 minutes au PBS. Une fois les tissus prêts, la sonde spécifique à l'ARNm que l'on veut détecter est ajoutée, ici il s'agit d'une sonde *Celsr3* (319241, ACD), et les échantillons sont placés durant 2 heures dans le four HybEZ à 40°C avant d'être rincés 2 X 2 minutes dans du tampon de lavage (310091, ACD). Ensuite, le signal est amplifié grâce à 6 étapes d'amplification. Tout d'abord, le premier amplificateur (322360, ACD) est déposé 30 minutes sur lame à 40°C avant d'être rincé 2 X 2 minutes dans du tampon de lavage (cette étape suit chaque amplification), après, le second amplificateur est déposé 15 minutes sur lame à 40°C le troisième durant 30 minutes à 40°C, le quatrième durant 15 minutes à 40°C, le cinquième durant 30 minutes à température ambiante et le sixième durant 15 minutes à température ambiante. Après cela, le signal sera détecté en ajoutant 2 μ l de Red B et 118 μ l de Red A (322360, ACD) par section durant 10 minutes avant que les lames soient lavées 2X5 minutes dans le tampon de lavage. Enfin, afin de monter les lames et de réaliser une contre-coloration au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, D9564, Sigma), les lames sont incubées 5 minutes avec du DAPI dilué 1000X et rincées 3X5 minutes au PBS, ensuite une goutte de Mowiol (81381-250G, Merck) est placée sur les échantillons et une lamelle est déposée sur les lames qui sècheront durant 2 heures dans le noir avant de prendre des photos.

- Prise de photos au microscope :

Les images des coupes où l'ARNm de *Celsr3* et l'ADH ont été marqués, sont prises grâce à un microscope confocal Olympus FLUOVIEW FV1000. Les rayonnements émis par le Red A sont mesurés à 568 nm, ceux de l'Alexa Fluor Green à 488 nm et ceux du DAPI à 470 nm. Tandis que les images des coupes où l'on peut voir les neurofilaments et l'histologie générale des tissus (coloration Hématoxyline- Éosine), ont été prises grâce à un microscope Axioskop 40 Zeiss.

Analyse statistique :

Toutes les données sont analysées grâce à EXCEL et sont exprimées comme étant la moyenne +/- l'erreur standard à ma moyenne (SEM). Afin de comparer les moyennes, le t-test des données non-appariées de STUDENT est utilisé et $\alpha = 0,05$ est défini comme étant le niveau de signification. Ce qui signifie qu'une différence entre les moyennes n'est jugée significative que si $P < 0,05$.

Résultats :

Tests cognitifs :

Étant donné que chez l'humain, une mutation faux sens du gène *CELSR3* est associée à un déficit intellectuel, à un retard de langage et de développement psychomoteur, nous avons voulu voir si des souris possédant la même mutation auraient elles aussi des déficits cognitifs. Afin de vérifier cela, trois tests cognitifs ont été réalisés, l'Open Field, le labyrinthe en Y et la piscine de Morris (Figure 10).

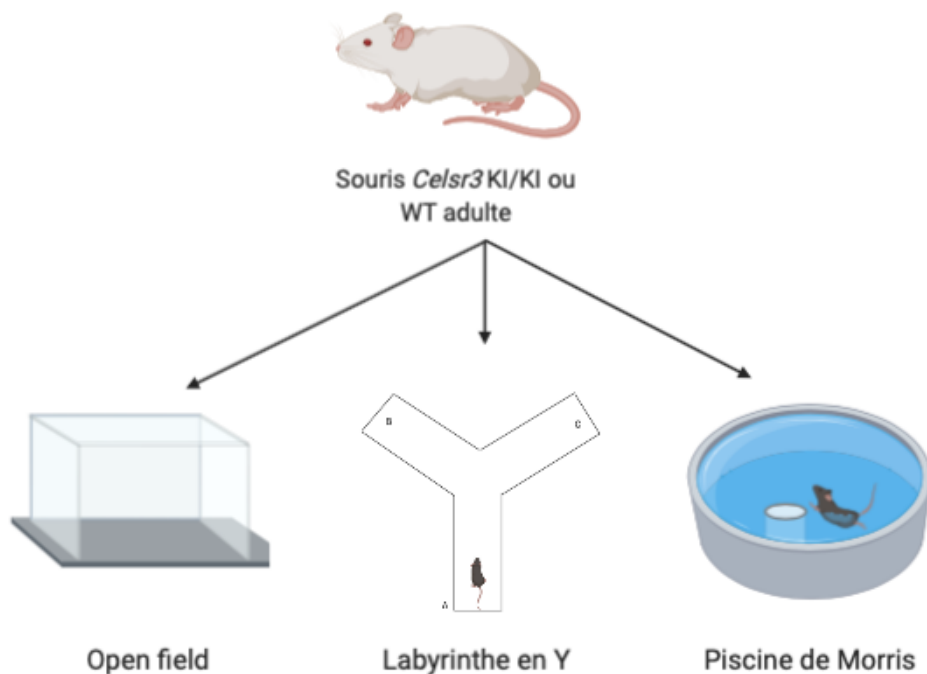


Figure 10 : Plan expérimental cognitif. Durant ce projet, les souris possédant la mutation humaine et leurs frères et sœurs WT ont passées trois tests cognitifs différents : L'Open field, le labyrinthe en Y et la piscine de Morris. L'image a été réalisée avec Biorender.

- Open field :

Tout d'abord, nous avons voulu évaluer l'anxiété, la locomotion et la mémoire des souris possédant la mutation humaine de *Celsr3*. Pour se faire, l'open field a été utilisé et comme nous pouvons le voir, aussi bien les souris *Celsr3* WT (n=11) que les souris *Celsr3* KI/KI (n=11) passent beaucoup plus de temps en périphérie qu'au centre de l'open field (Figure 11 A). De plus, les souris *Celsr3* WT et *Celsr3* KI/KI ne passent pas plus de temps au centre le deuxième

jour. Cela signifie que les souris possédant la mutation humaine sont aussi anxieuses que les souris contrôles car elles passent plus de temps en périphérie qui est moins anxiogène pour les souris. Deuxièmement, nous pouvons observer que les souris *Celsr3* WT et *Celsr3* KI/KI semblent parcourir moins et moins vite l'open field le deuxième jour même si cette diminution n'est pas significative (Figure 11B, C). Donc nous pouvons en conclure que les souris *Celsr3* KI/KI n'ont pas de problèmes locomoteurs car elles parcourent la même distance et vont à la même vitesse que les souris contrôles. De plus, toutes les souris se souviennent de l'open field car le deuxième jour elles explorent moins l'espace.

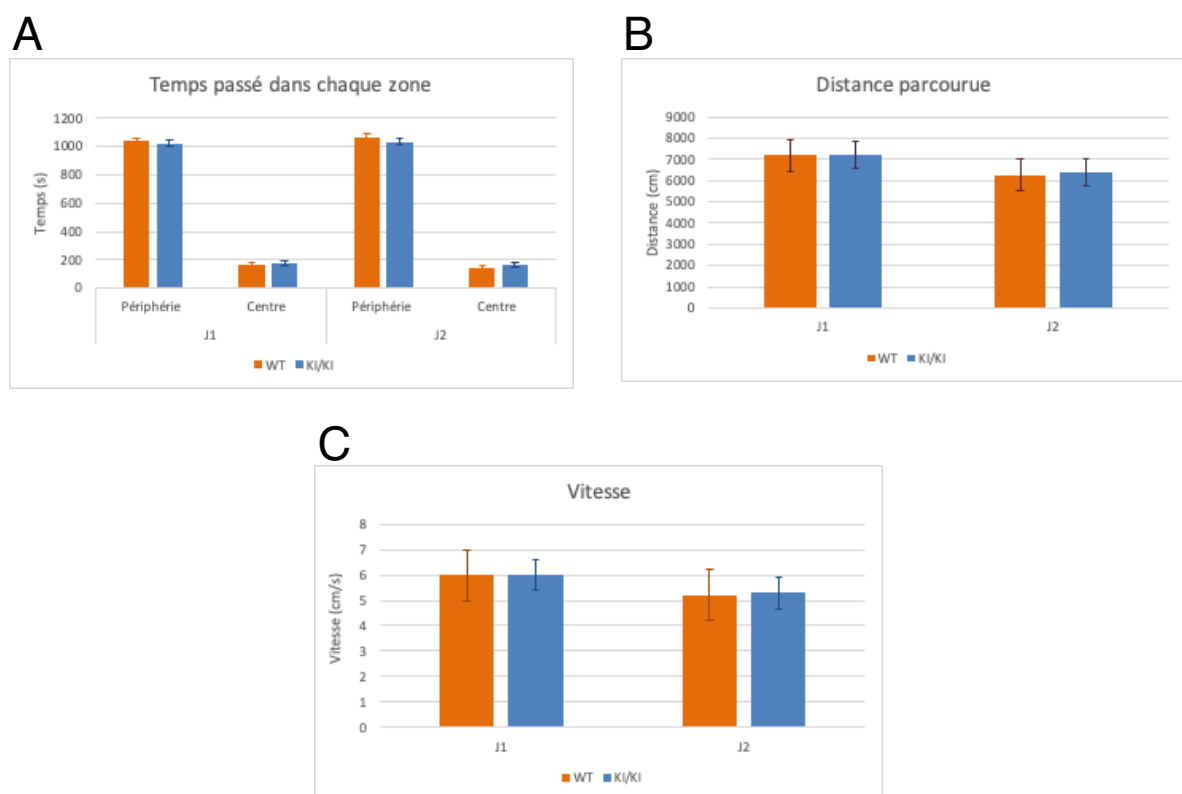


Figure 11 : Comparaison de l'anxiété et de la motricité des souris *Celsr3* WT et *Celsr3* KI/ KI.

(A) Temps passé en périphérie et au centre de l'Open field le jour 1 et le jour 2 pour chaque groupe (WT ou KI/KI). WT, n=11 ; KI/KI, n= 11. P-valeur >0,05.

(B) Distance parcourue le jour 1 et le jour 2 pour chaque groupe (WT ou KI/KI). WT, n=11 ; KI/KI, n= 11. P-valeur >0,05.

(C) Vitesse le jour 1 et le jour 2 pour chaque groupe (WT ou KI/KI). WT, n=11 ; KI/KI, n= 11. P-valeur >0,05.

Les p-valeurs ont été obtenues grâce au test de Student et les données représentent la moyenne +/- l'erreur type.

- Labyrinthe en Y :

Ensuite, grâce au labyrinthe en Y, nous avons voulu étudier la mémoire de travail des souris *Celsr3* KI/KI. Nous observons qu'il n'y a pas de différence significative entre les souris mutantes (n=11) et les contrôles (n=10) à la fois pour le nombre d'entrées dans chaque bras et pour le pourcentage d'alternance (Figure 12). Cela veut donc dire que aussi bien les souris possédant la mutation humaine que les souris contrôles se souviennent de quel bras elles ont déjà exploré ou non, donc ne souffrent pas de problème de mémoire spatiale.

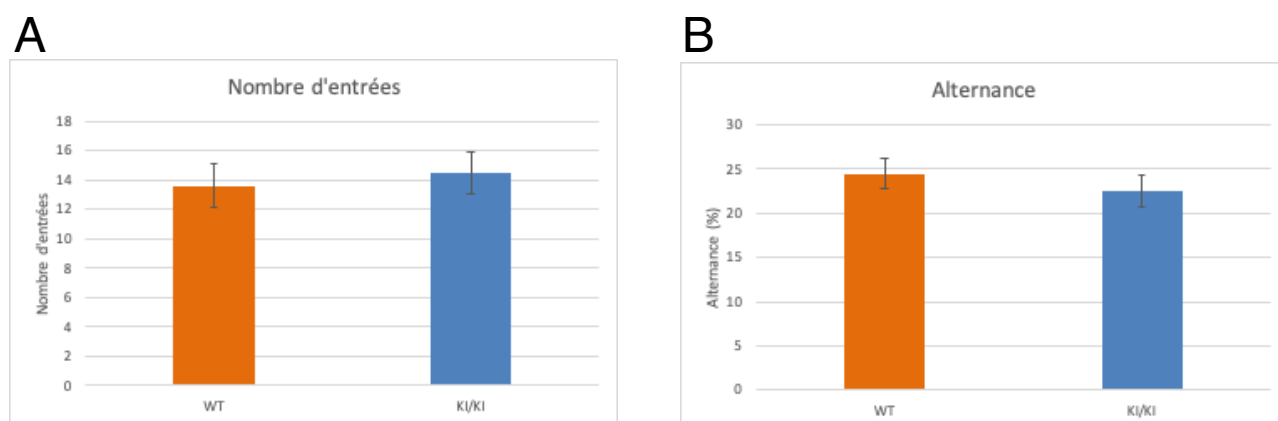


Figure 12 : Comparaison de la mémoire spatiale de souris *Celsr3* WT et *Celsr3* KI/KI.

(A) Somme du nombre d'entrées dans chaque bras du labyrinthe pour chaque groupe (WT ou KI/KI). WT, n=10 ; KI/KI, n= 11. P-valeur = 0,61 >0,5.

(B) Pourcentage d'alternance entre chaque bras du labyrinthe pour chaque groupe (WT ou KI/KI). WT, n=10 ; KI/KI, n= 11. P-valeur = 0,42 >0,5.

- Piscine de Morris :

Ayant montré que les souris *Celsr3* KI/KI n'ont pas de problèmes de mémoire de travail et de locomotion, nous avons ensuite voulu voir si elles avaient des problèmes de mémoire spatiale. Pour se faire, nous avons utilisé la piscine de Morris qui consiste à placer une souris dans une piscine avec une plateforme et des repères visuels et de voir combien de temps elle mettra à trouver la plateforme au fil des jours et de son apprentissage. Comme nous pouvons le voir, les souris *Celsr3* KI/KI (n=10) mettent de moins en moins de temps à trouver les plateformes et leur temps d'évasion n'est pas statistiquement différent de celui des souris *Celsr3* WT (n=10, Figure 13 A). Ensuite, les souris sont placées une nouvelle fois dans la piscine mais cette fois-ci sans plateforme afin d'évaluer leur mémoire de rétention, c'est le test d'investigation. Et comme on peut le voir, toutes les souris passent la majorité de leur temps dans le quart de la

piscine qui contenait la plateforme lors des jours précédents (Figure 13 C), même si le temps passé par les *Celsr3* WT dans le quart Nord-Ouest ne diffère pas statistiquement du temps passé dans le quart où se trouvait la plateforme. De plus, nous avons suivi à quelle vitesse nageaient les souris lors du test d'investigation (Figure 13 B) et nous pouvons voir que les souris mutantes nagent aussi vite que les souris contrôles. Donc grâce à ce test, nous pouvons conclure que les souris *Celsr3* KI/KI n'ont pas de problèmes moteur, ont une aussi bonne mémoire spatiale que les contrôles et que ces souris n'ont pas de problèmes de rétention.

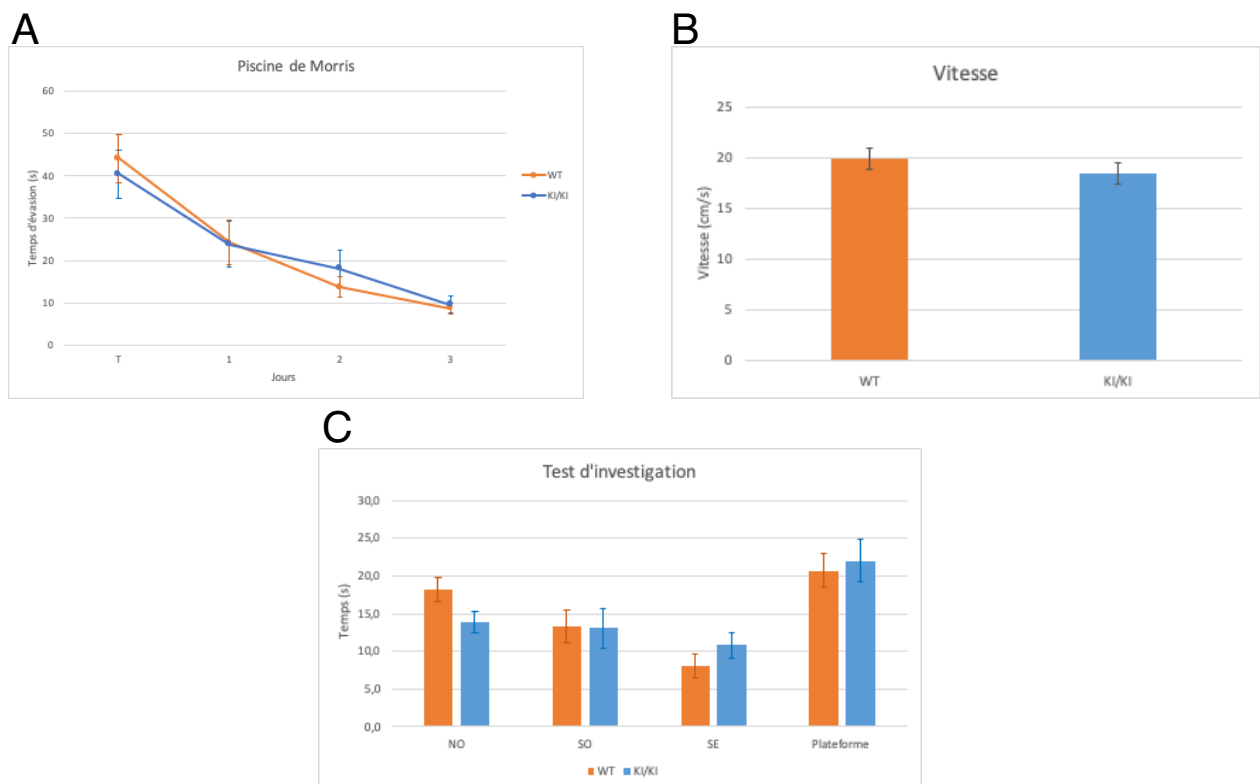


Figure 13 : Comparaison de l'apprentissage chez des souris *Celsr3* WT et *Celsr3* KI/KI.

(A) Temps que met chaque groupe à trouver la plateforme au fil des jours. WT, n=10 ; KI/KI, n= 10;. P-valeur >0,5.

(B) Vitesse à laquelle se déplacent les souris lors du probe test. WT, n=10 ; KI/KI, n= 10. P-valeur= 0,27 >0,5.

(C) Temps passé dans chaque quadrant lorsque la plateforme a été retirée. WT, n=10 ; KI/KI, n= 10. P-valeur >0,5.

Grâce à ses différents tests cognitifs, nous pouvons conclure que les souris possédant la mutation humaine de *CELSR3* n'ont aucun déficit de mémoire ou d'apprentissage, que ce soit pour la mémoire de travail ou la mémoire spatiale. De plus, ces souris ne souffrent pas d'anxiété ou de problèmes locomoteurs. Cela signifie que la mutation chez la souris ne cause pas le même phénotype que chez l'homme.

Tests métaboliques :

En plus de tests cognitifs, nous avons réalisé des tests métaboliques (Figure 14), car les patients possédant la mutation faux sens du gène *CELSR3*, souffrent de problèmes de croissance et de diabète insipide. Mon laboratoire d'accueil a observé des différences de poids entre des souris *Celsr3 KI/KI* âgées (> 1an) et *Celsr3 WT* de la même portée et du même sexe. C'est pourquoi en plus des physio-cages, nous avons réalisé des mesures régulières (chaque semaine) du poids des souris et des ELISA afin de savoir si les possibles différences de poids seraient dues à des problèmes hormonaux. En plus de cela, nous avons réalisé des mesures de volume urinaire, d'osmolarité urinaire afin de vérifier si les souris mutantes souffrent elles aussi de diabète insipide comme l'homme.

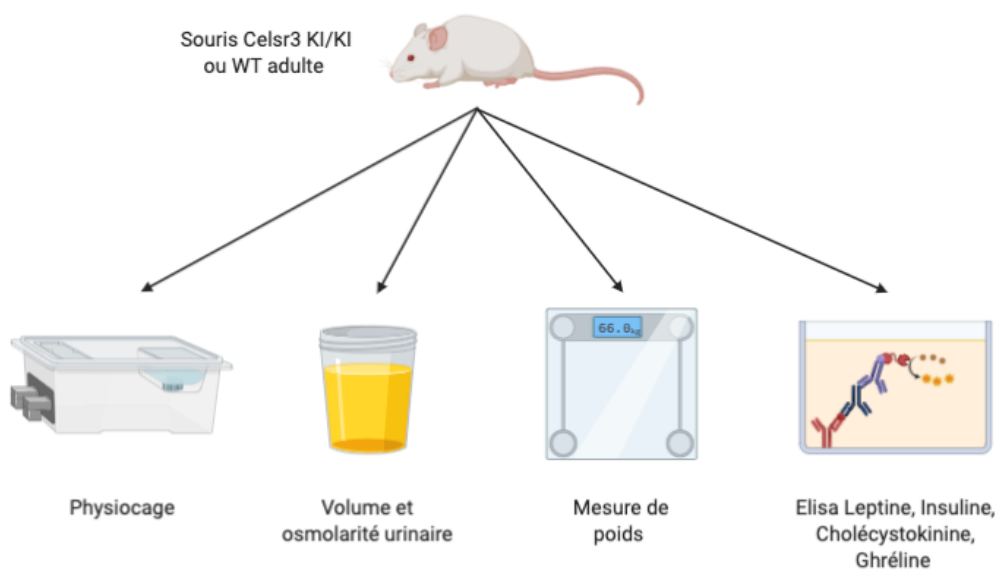


Figure 14 : Plan expérimental métabolique. *Durant ce projet, nous avons voulu savoir si les souris KI souffrent de problème de poids et de diabète urinaire. Donc pour ce faire, des souris Celsr3 KI/KI et Celsr3 WT ont été placées dans des physio-cages, ont été suivies pour leur poids, leurs urines ont été analysées et la concentration plasmatique en hormone du circuit de contrôle de la faim a été mesurée grâce à des Elisa. L'image a été réalisée avec Biorender.*

- Physio-cages :

Tout d'abord, nous avons voulu savoir si les différences de poids observées étaient dues au fait que les souris mutantes mangeaient trop et ne bougeaient pas assez. Pour répondre à cette question, des souris possédant la mutation humaine et leurs souris contrôles ont été placées

durant 24 heures dans des cages métaboliques. Grâce à cela, nous avons vu que les souris mutantes (n=11) bougent et se redressent autant que des souris *Celsr3* WT (n=12, Figure 15 A et B), et qu'elles ne mangent et ne boivent pas plus que leurs contrôles (Figure 15 C et D). Cela signifie que si nous avons observés des souris *Celsr3* KI/KI plus grosses que des souris *Celsr3* WT, cela n'était pas dû au fait qu'elles bougent moins ou mangent plus. Enfin, les souris *Celsr3* KI/KI ne possèdent pas l'un des symptômes du diabète insipide, qui est de boire excessivement, ce qui n'exclut pas pour autant qu'elles ne souffrent pas de ce diabète.

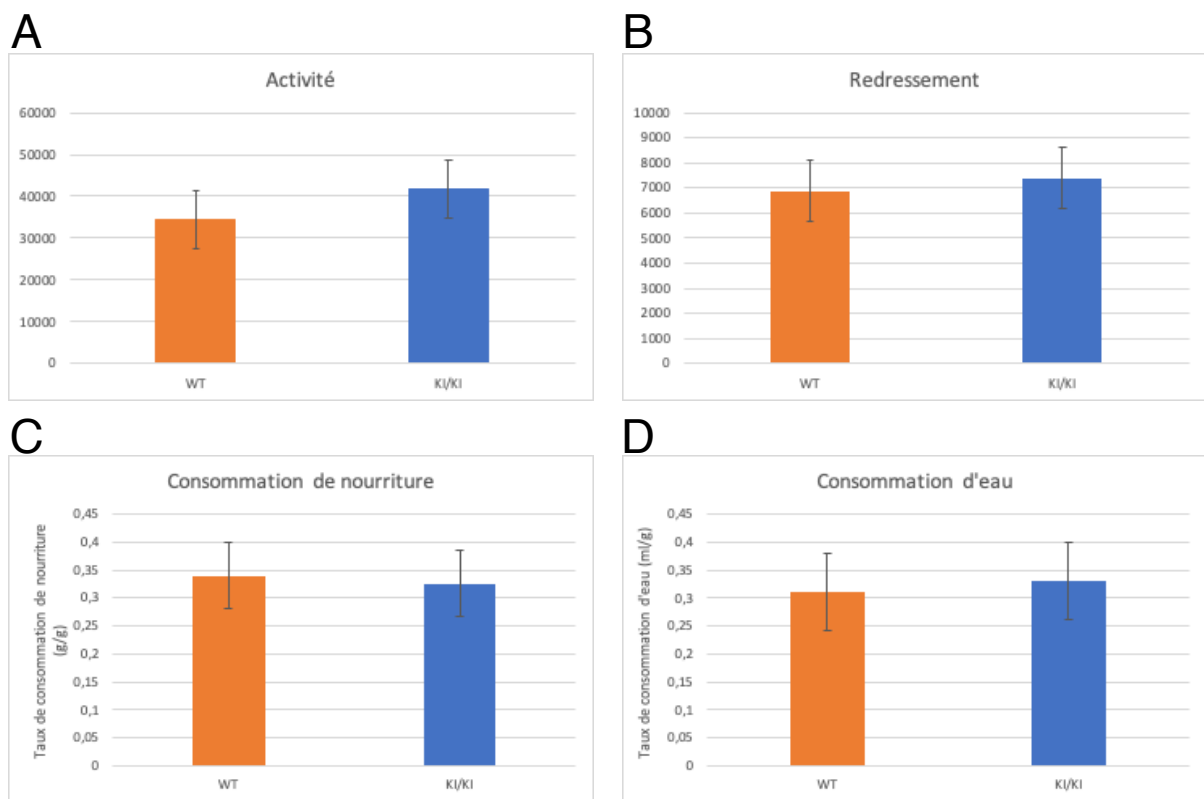


Figure 15 : Comparaison de l'activité et de la consommation de souris *Celsr3* WT et *Celsr3*KI/KI.

(A) Comparaison de l'activité de souris WT (n=12) et KI/KI (n=11) en unité arbitraire. P-valeur=0,43>0,05.

(B) Comparaison des redressements de souris WT (n=12) et KI/KI (n=11) en unité arbitraire. P-valeur=0,71>0,05.

(C) Comparaison de la consommation de nourriture par rapport au poids des souris WT (n=12) et KI/KI (n=11). P-valeur=0,86>0,05.

(D) Comparaison de la consommation d'eau rapportée au poids des souris WT (n=12) et KI/KI (n=11). P-valeur=0,84>0,05.

- Mesures de poids :

Nous avons suivi l'évolution du poids au fil des semaines de 7 souris *Celsr3* WT et de 7 *Celsr3* KI/KI de la même portée durant 10 semaines (de P22 à P85). Et comme nous pouvons le voir, il n'y a pas de différence significative entre les poids des souris *Celsr3* KI/KI et *Celsr3* WT (Figure 16). Cependant, à partir du jour 43, le poids des souris possédant la mutation humaine est supérieur et reste supérieur à celui des souris contrôles.

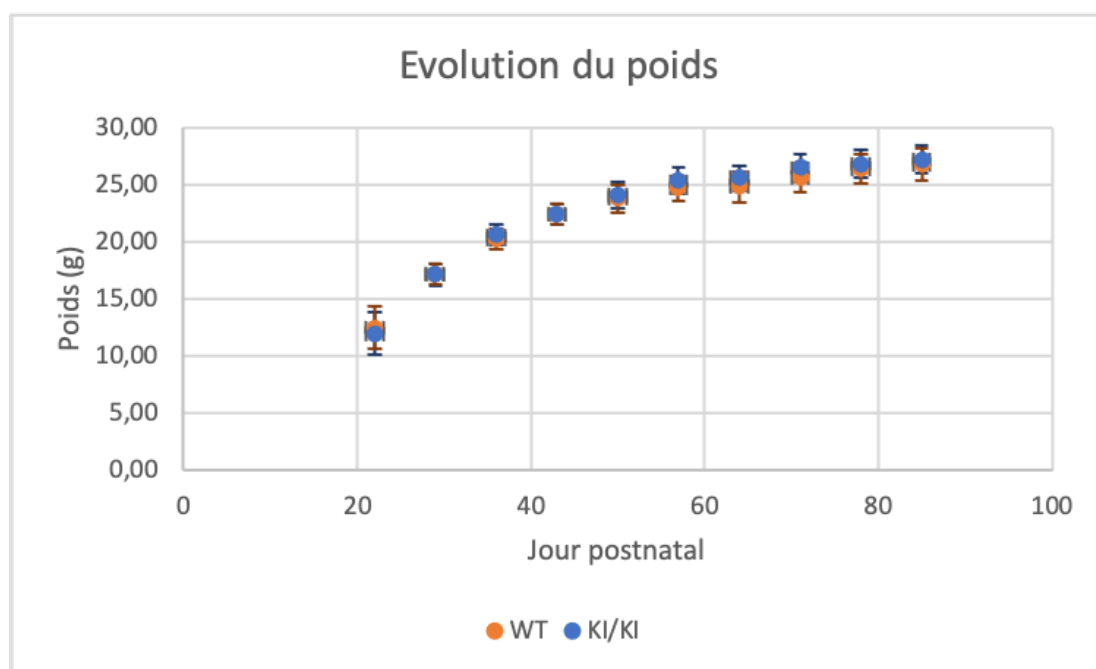


Figure 16 : Comparaison de l'évolution du poids de souris *Celsr3* WT et *Celsr3* KI/KI.

Comparaison du poids au fil des semaines de souris WT (n=7) et KI/KI (n=7). P-valeur >0,05.

- Mesures urinaires :

Étant donné que les souris mutantes ne boivent pas plus que les souris contrôles, nous avons voulu vérifier si elles possédaient d'autres symptômes de diabète insipide tels que le fait d'uriner plus et le fait que l'urine soit plus diluée en conditions normales. Afin d'analyser l'urine, les souris sont placées dans des cages spéciales permettant de récolter uniquement l'urine dans des conditions « normales » (sans nourriture) et en condition de privation d'eau, sans nourriture également. Nous avons pu mesurer que sans eau, les souris *Celsr3* KI/KI (n=10) et *Celsr3* WT (n=7) urinaient moins (Figure 17 A), même si la diminution du volume urinaire n'est pas significative pour les souris *Celsr3* WT, nous pouvons quand même observer une tendance à la diminution. De plus, les deux types de souris arrivent à concentrer leurs urines en

condition de privation d'eau (Figure 17 B). Ce test ne montre aucun symptôme de diabète insipide chez les souris possédant la mutation humaine de *Celsr3*. En effet, si les souris souffraient de diabète insipide, nous nous attendrions à ce que le volume urinaire ne change pas si les souris n'ont pas accès à l'eau et à ce que les souris ne parviennent pas à concentrer leurs urines.

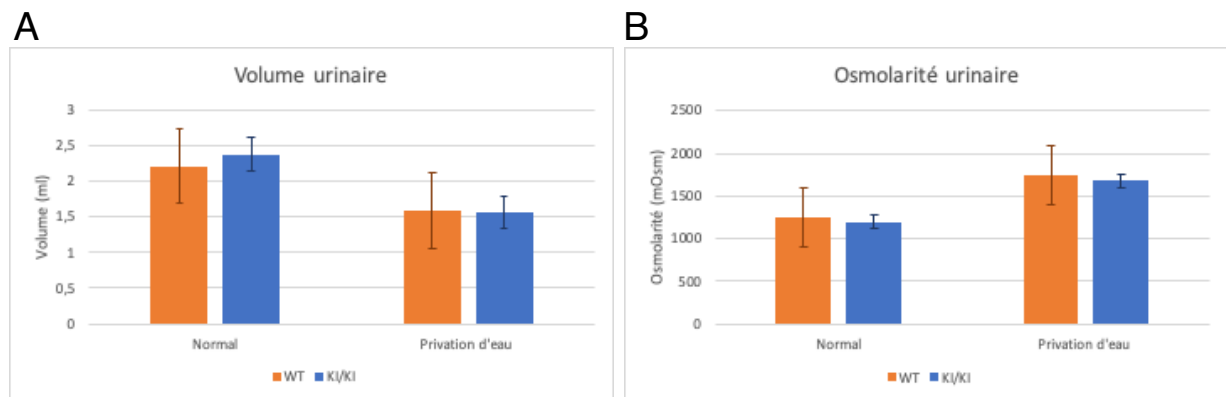


Figure 17 : Comparaison du volume et de l'osmolarité urinaire des souris *Celsr3* WT et *Celsr3* KI/KI.

(A) Comparaison du volume urinaire sur 24h de souris mâles WT (n=6) et KI/KI (n=10). P-valeur >0,05 sauf si l'on compare le volume urinaire des souris *Celsr3* KI/KI en condition normale et sans eau, P-valeur = 0,002 .

(B) Comparaison de l'osmolarité urinaire de souris mâles WT (n=6) et KI/KI (n=10). P-valeur <0,05 si l'on compare avec et sans accès à l'eau.

- Elisa :

En plus d'une mesure de poids régulière, nous avons voulu étudier plusieurs hormones du circuit de contrôle de la faim. Pour ce faire, nous avons mesuré la concentration plasmatique en Leptine, en Insuline, en Cholécystokinine et en ghréline grâce à des ELISA. Et comme nous pouvons le voir, il n'y a pas de différences significatives entre les souris *Celsr3* KI/KI (n=9 et 5 pour la cholécystokinine) et *Celsr3* WT (n=7 et 3 pour la cholécystokinine, Figure 18), suggérant que s'il y a bien une différence de poids entre les souris *Celsr3* WT et KI/KI, cette différence ne serait pas due à ces trois hormones. Cependant, nous pouvons observer une tendance à la hausse pour la concentration plasmatique en insuline chez les souris *Celsr3* KI/KI (p-valeur = 0,07). Cette augmentation de l'insuline pourrait être un signe de diabète de type 2, qui se caractérise par une insensibilité à l'insuline.

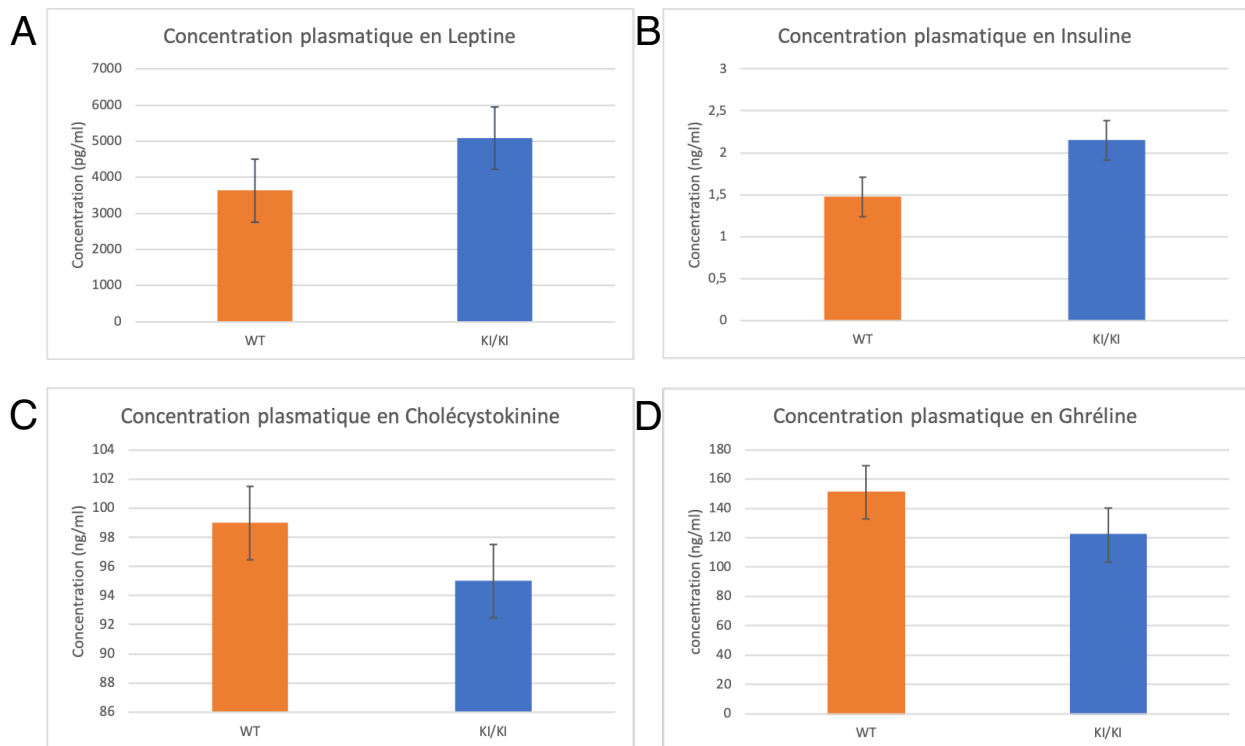


Figure 18 : Comparaison de la concentration plasmatique en hormone du circuit de la faim entre des souris *Celsr3* WT et *Celsr3* KI/KI.

(A) Comparaison de la concentration plasmatique en Leptine de souris mâles WT (n=7) et KI/KI (n= 9) à jeun. P-valeur = 0,23 > 0,05.

(B) Comparaison de la concentration plasmatique en Insuline de souris mâles WT (n=7) et KI/KI (n= 9) à jeun. P-valeur = 0,07 > 0,05.

(C) Comparaison de la concentration plasmatique en Cholécystokinine de souris mâles WT (n=3) et KI/KI (n= 5) à jeun. P-valeur = 0,31 > 0,05

(D) Comparaison de la concentration plasmatique en Ghréline de souris mâles WT (n=7) et KI/KI (n= 9) à jeun. P-valeur = 0,17 > 0,05

Histologie :

Enfin, nous avons d'une part étudié l'expression de *Celsr3* dans l'axe hypothalamo-hypophysaire (Figure 20) et d'autre part, nous avons analysé la structure de cet axe et sa fonction dans trois modèles de souris différents : des souris dont le gène *Celsr3* est délété de toutes les cellules, des souris dont ce gène est délété dans l'adénohypophyse, et des souris possédant la mutation humaine décrite plus haut. Pour l'étude de l'expression, nous avons hybridé des sondes marquées d'ARNm de *Celsr3* sur des coupes de cerveau de souris CD1 E14,5 et P0 grâce à la technologie du RNAscope. Pour l'étude de la structure de l'axe hypothalamo hypophysaire, des coupes de cerveau ont été colorées à l'Hématoxyline-Éosine

ou marquées avec des anticorps anti- neurofilaments (immuno-histochimie) ou anti-ADH (immuno-fluorescence, Figure 19).

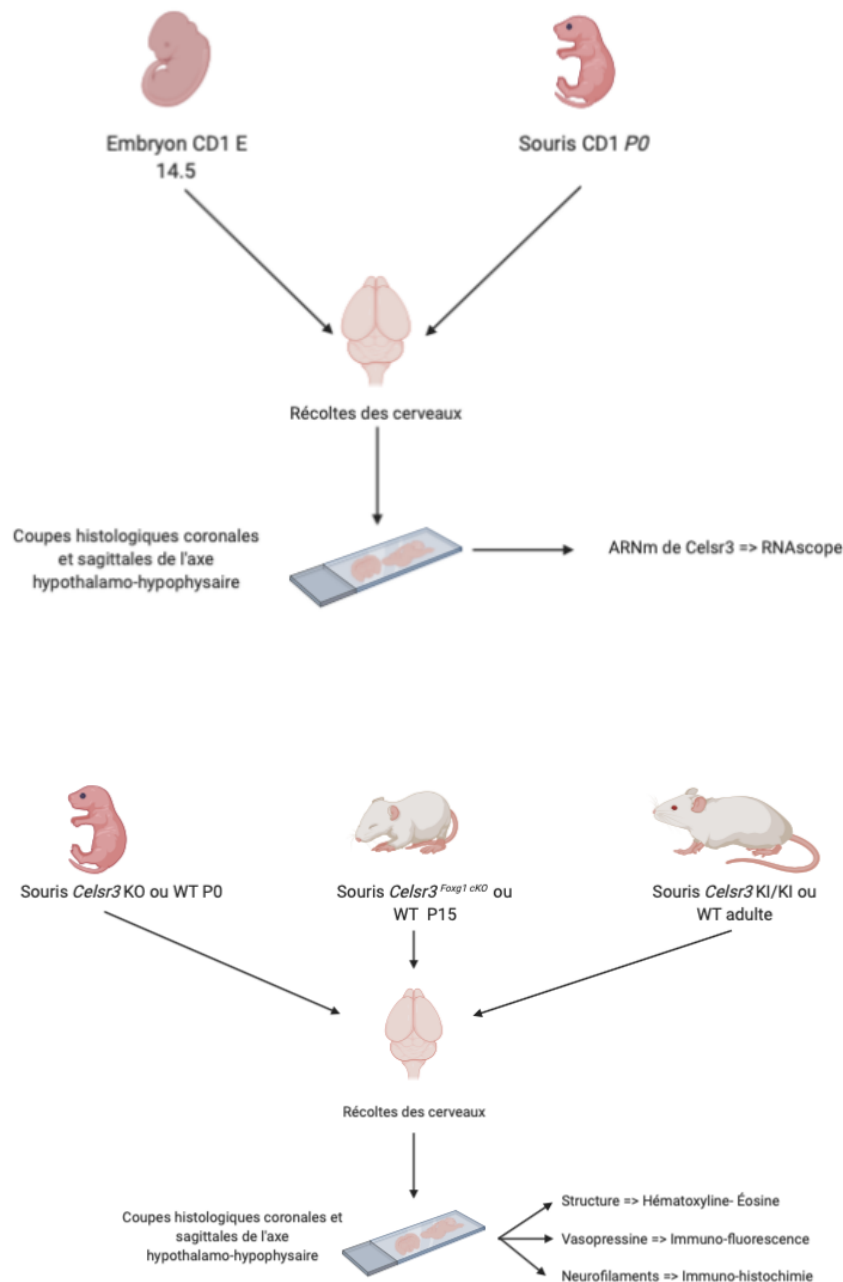


Figure 19 : Plan expérimental histologique. Durant ce projet, quatre types de souris ont été utilisées, des souris CD1, des souris dont le gène *Celsr3* est délété dans toutes les cellules (*Celsr3* KO), des animaux où le gène est délété uniquement dans le télencéphale et l'adénohypophyse (*Celsr3^{Foxg1 cKO}*) et des souris mâles où une mutation ponctuelle a été intégrée dans le gène *Celsr3* (*Celsr3* KI/KI). Des souris WT de la même portée ont été utilisées comme contrôle. Tout d'abord, l'expression de *Celsr3* a été étudiée chez les souris CD1 au jour embryonnaire 14,5 et le jour de leur naissance. Ensuite, la structure de l'axe hypothalamo-hypophysaire a été étudiée, ainsi de la localisation des neurofilaments et de l'ADH chez des souris *Celsr3* KO P0, *Celsr3^{Foxg1 cKO}* P15 et *Celsr3* KI/KI adultes. L'image a été réalisée avec Biorender.

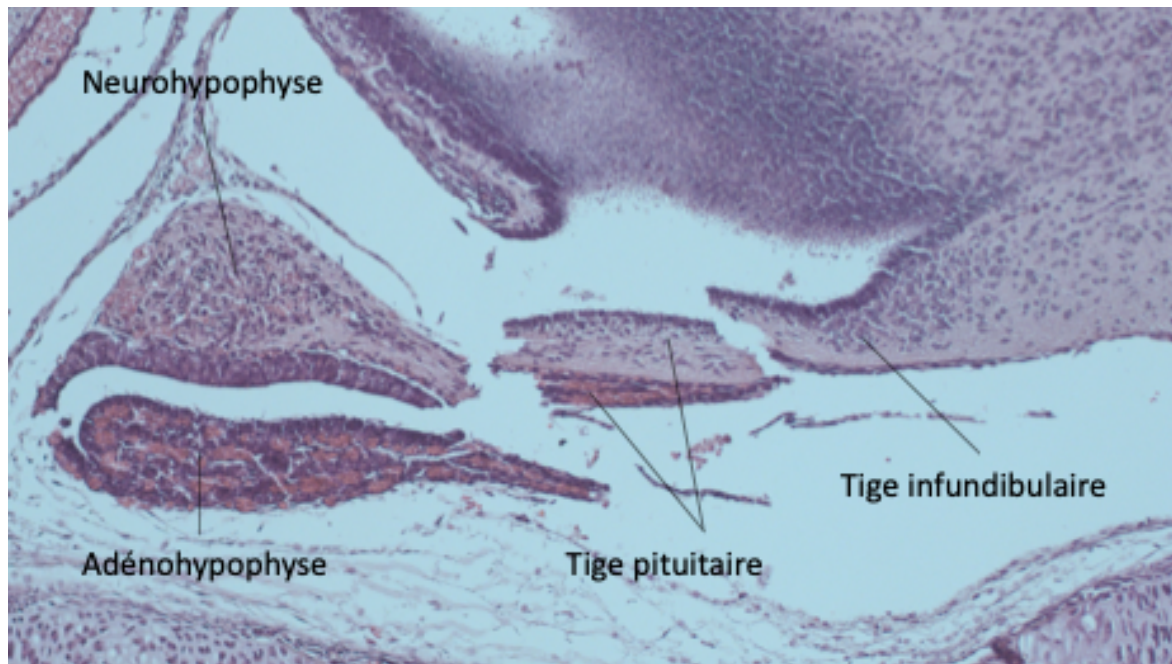


Figure 20 : Coupe sagittale légendée de la tige pituitaire d'une souris WT P0 colorée à l'Hématoxyline-Éosine grossissement 10X. Coupe de l'axe hypothalamo-hypophysaire, où l'on peut voir que l'hypothalamus est connecté à la neurohypophyse grâce à la tige infundibulaire qui est appelée après la tige pituitaire. Nous pouvons aussi voir sur cette image l'adénohypophyse qui est plus antérieure.

- Étude de l'expression de *Celsr3* par RNAscope :

Afin d'étudier l'expression de *Celsr3* dans l'axe hypothalamo-hypophysaire nous avons hybridé des sondes marquées d'ARNm de *Celsr3* sur des coupes de cerveaux de souris CD1 E14,5 et P0 grâce à la technologie du RNAscope. Comme nous pouvons le voir, l'ARNm de *Celsr3* est exprimé dans l'adénohypophyse au jour embryonnaire 14.5 (Figure 21 A, encadré blanc) et au jour postnatal 0 (Figure 21 B, flèche blanche). Cependant, l'ARNm de *Celsr3* ne se trouve ni dans la tige pituitaire, ni dans la neurohypophyse au jour postnatal 0 (Figure 21 B, flèche rouge). Cela peut s'expliquer par le fait que la neurohypophyse ne se compose pas de neurones mais de projections axonales venant de l'hypothalamus, de cellules gliales et de vaisseaux (Figure 21 D), comme nous pouvons le voir sur les coupes où les noyaux des cellules sont marqués avec du DAPI.

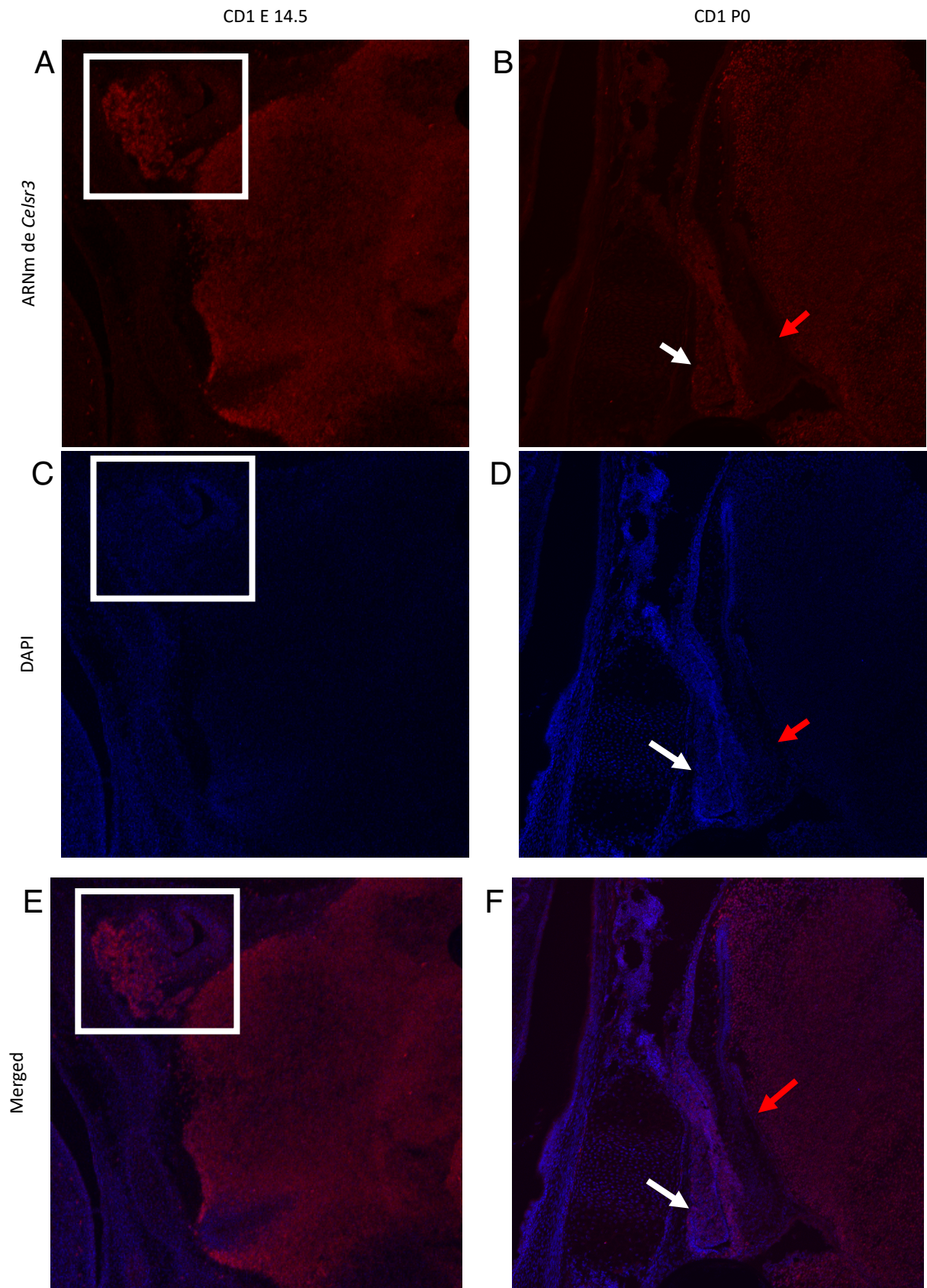


Figure 21: Marquage par hybridation in-situ de l'ARNm de *Celsr3* dans la tige pituitaire de souris CD1 E 14.5 et P0. (A) Marquage de l'ARNm de *Celsr3* dans la tige pituitaire de souris CD1 au jour embryonnaire 14.5 en coupe sagittale. (B) Marquage de l'ARNm de *Celsr3* dans la tige pituitaire de souris CD1 au jour postnatal 0 en coupe sagittale. . (C) Marquage des noyaux grâce à DAPI dans la tige pituitaire de souris CD1 au jour embryonnaire 14.5 en coupe sagittale. (D) Marquage des noyaux grâce à DAPI dans la tige pituitaire de souris CD1 au jour postnatal 0 en coupe sagittale. (E) Marquage de l'ARNm de *Celsr3* et des noyaux grâce à DAPI dans la tige pituitaire de souris CD1 au jour embryonnaire 14.5 en coupe sagittale. (F) Marquage de l'ARNm de *Celsr3* et des noyaux grâce à DAPI dans la tige pituitaire de souris CD1 au jour postnatal 0 en coupe sagittale. Le carré blanc correspond à la future adénohypophyse, la flèche blanche à l'adénohypophyse et la flèche rouge à la neurohypophyse.

- *Celsr3* KI/KI :

Ensuite, nous avons analysé la structure de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez des souris possédant la mutation humaine du gène *Celsr3* grâce à une coloration à l'Hématoxyline-Éosine. L'étude histologique des coupes de souris *Celsr3* WT ou KI/KI, a montré qu'à l'âge adulte, la tige pituitaire de souris possédant la mutation humaine semble identique à celle de souris WT comme nous pouvons le voir en coupe sagittale et en coupe coronale (Figure 22). Cela signifierait que la mutation du gène *Celsr3* trouvée chez l'homme ne modifie pas la structure de l'axe-hypothalamo-hypophysaire de la souris.

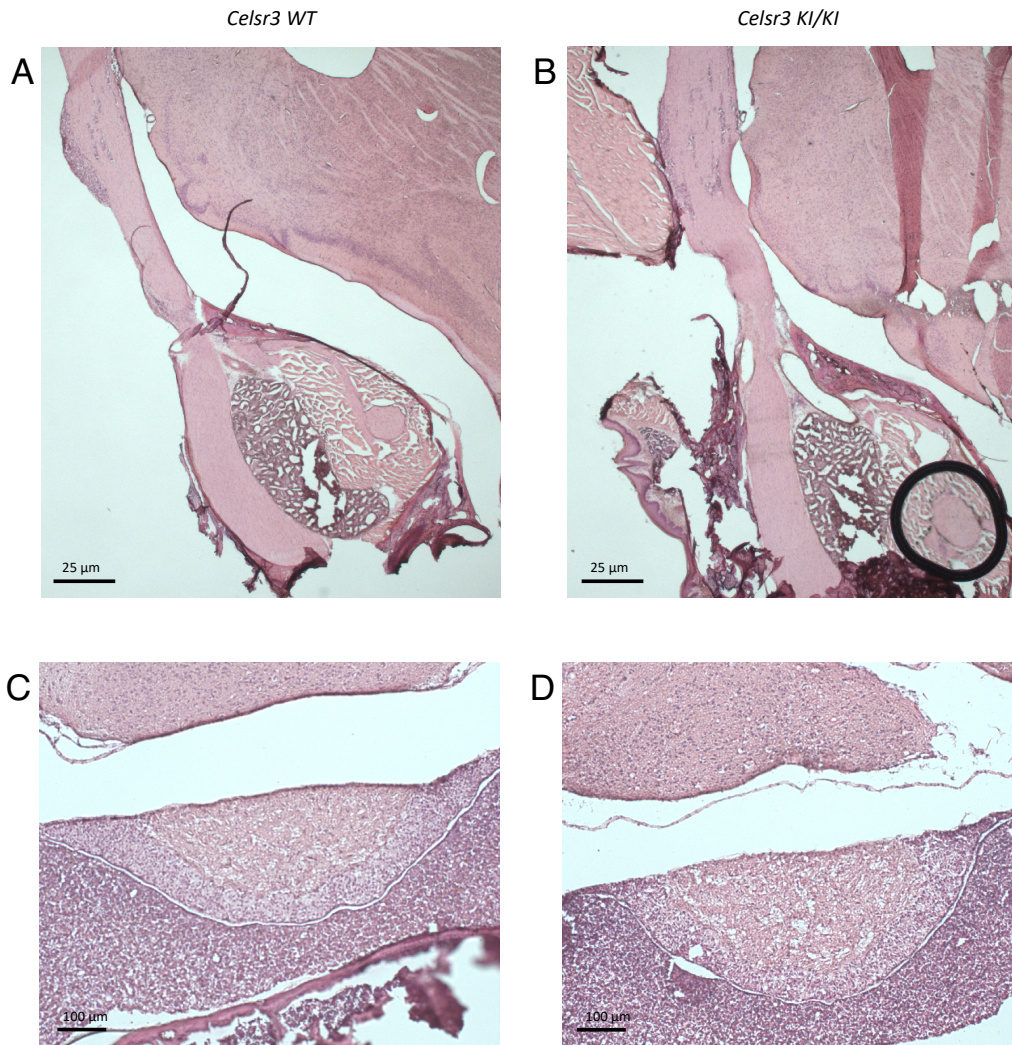


Figure 22: Coupe de la tige pituitaire de souris *Celsr3* WT et KI/KI adultes colorée à l'Hématoxyline-Éosine.
 (A) Tige pituitaire de souris *Celsr3* WT adulte en coupe sagittale. (B) Tige pituitaire de souris *Celsr3* KI/KI adulte en coupe sagittale. (C) Tige pituitaire de souris *Celsr3* WT adulte en coupe coronale. (D) Tige pituitaire de souris *Celsr3* KI/KI adulte en coupe coronale.

- *Celsr3* KO :

Ensuite, nous avons analysé la structure de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez des souris dont le gène *Celsr3* est délété de l'organisme entier, après coloration l'Hématoxyline-Éosine et analyses immunohistochimiques à l'aide d'anticorps anti-neurofilaments et anti-ADH. L'étude histologique des coupes de souris *Celsr3* WT ou KO, a montré qu'au jour postnatal 0, la tige pituitaire de souris KO semble plus fine que celle de souris WT (Figure 23). De plus, nous pouvons aussi constater que la neurohypophyse paraît plus petite chez le mutant (Figures 23 et 24). En outre, lorsque nous comparons les souris WT et KO après marquage axonal

(neurofilament), nous remarquons que chez le mutant, il y a moins de neurofilaments et qu'ils se trouvent plus en périphérie de la neurohypophyse mais pas en profondeur contrairement à ce que nous pouvons observer chez les souris sauvages.. D'autre part, nous pouvons observer le même phénomène en ce qui concerne la vasopressine. En effet, nous pouvons voir que chez les souris mutantes, la vasopressine se localise en périphérie de la neurohypophyse et non en profondeur comme c'est le cas pour les souris sauvages (Figure 25). Cela pourrait signifier que les terminaisons axonales venant de l'hypothalamus (où la vasopressine est synthétisée) sont mal localisées chez les souris mutantes et auraient moins de contact avec les vaisseaux sanguins plus en profondeur de la neurohypophyse.

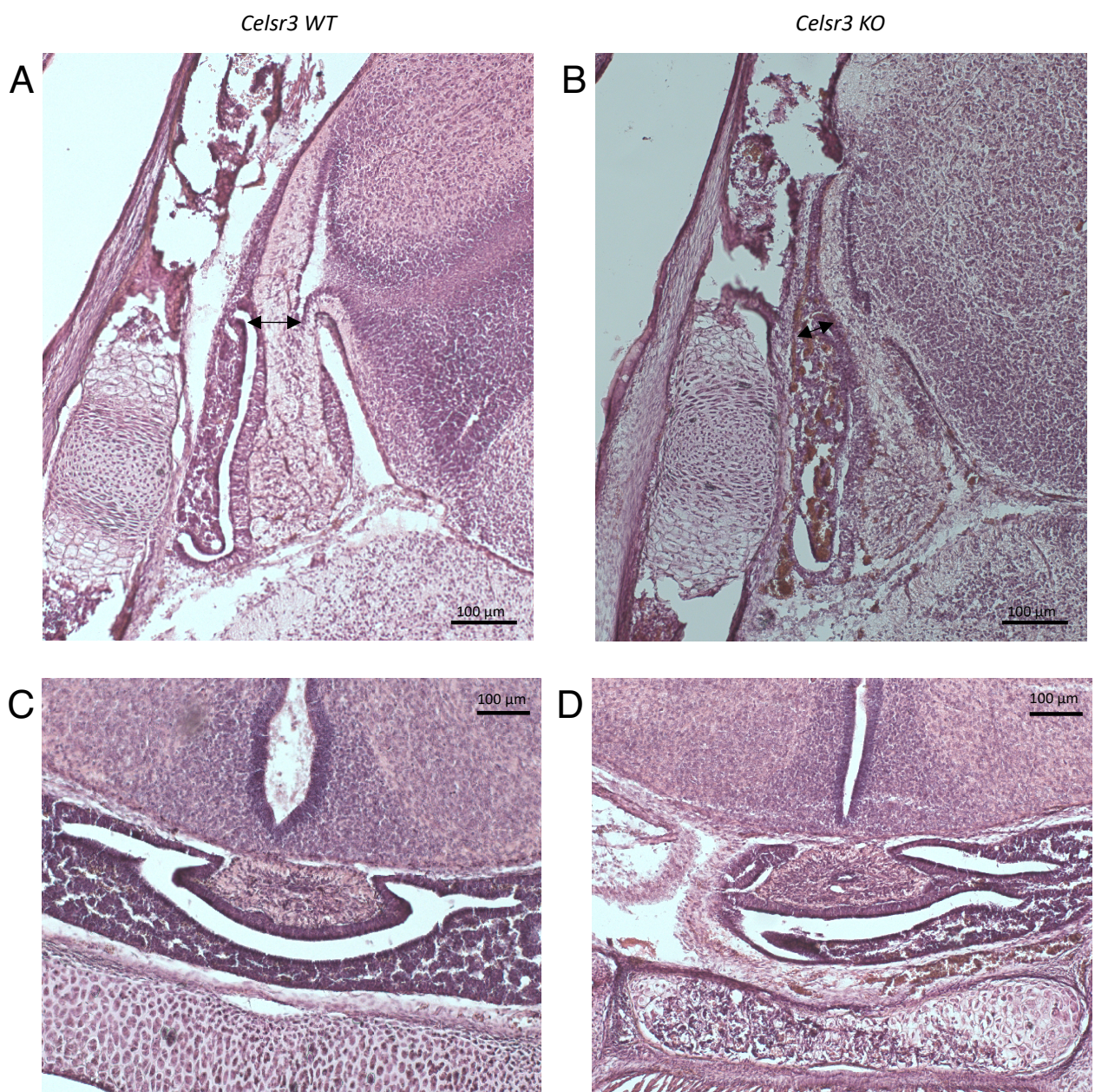


Figure 23 : Coupe de la tige pituitaire de souris Celsr3 WT et KO P0 colorée à l'Hématoxyline-Éosine. (A) Tige pituitaire de souris Celsr3 WT au jour postnatal 0 en coupe sagittale. (B) Tige pituitaire de souris Celsr3 KO au jour postnatal 0 en coupe sagittale. (C) Tige pituitaire de souris Celsr3 WT au jour postnatal 0 en coupe coronale. (D) Tige pituitaire de souris Celsr3 KO au jour postnatal 0 en coupe coronale.

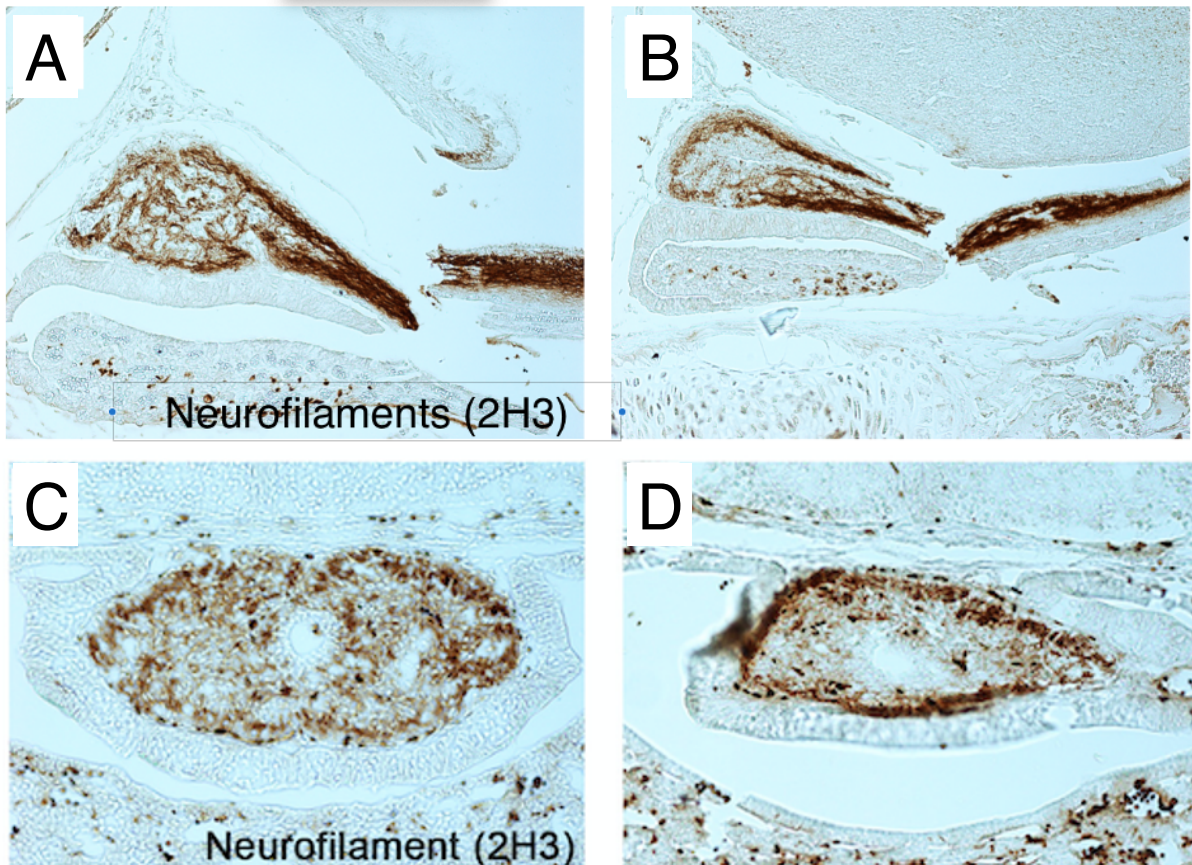


Figure 24 : Marquage immuno-histologique des neurofilaments (2H3) de la tige pituitaire de souris Celsr3 WT et KO P0. (A) Tige pituitaire de souris Celsr3 WT au jour postnatal 0 en coupe sagittale. (B) Tige pituitaire de souris Celsr3 KO au jour postnatal 0 en coupe sagittale. (C) Tige pituitaire de souris Celsr3 WT au jour postnatal 0 en coupe coronale. (D) Tige pituitaire de souris Celsr3 KO au jour postnatal 0 en coupe coronale.

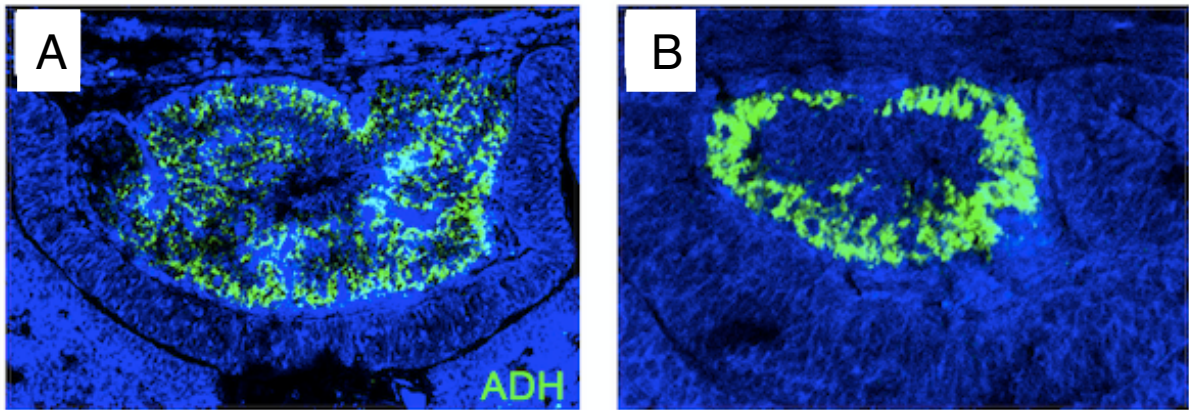


Figure 25: Marquage immuno-histologique de la vasopressine dans la tige pituitaire de souris *Celsr3* WT et *KO P0*. (A) Marquage de l'ADH (vert) et des noyaux (bleu) grâce à DAPI dans la tige pituitaire de souris *Celsr3* WT au jour postnatal 0 en coupe coronale. (B) Marquage de l'ADH (vert) et des noyaux (bleu) grâce à DAPI dans la tige pituitaire de souris *Celsr3* KO au jour postnatal 0 en coupe coronale.

- *Celsr3^{Foxg1 cKO}* :

Enfin, nous avons analysé la structure de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez des souris dont le gène *Celsr3* est délété dans l'adénohypophyse. Pour réaliser cela, les coupes de cerveaux ont été colorées à l'Hématoxyline-Éosine et l'étude histologique des coupes de cerveau de souris *Celsr3 f/+ ; Foxg1 Cre+* et *Celsr3 f/- ; Foxg1 Cre+* au jour postnatal 15, a montré que l'adénohypophyse (Figure 27 A et B) est plus petites chez la souris dont le gène *Celsr3* est délété de cette dernière. Cependant, contrairement à ce que l'on pourrait croire, la neurohypophyse n'est pas plus petites chez les souris *Celsr3 f/- ; Foxg1 Cre+* (Figure 26 C et D) comme nous avons pu le constater sur des coupes adjacentes (Figure 26 A et B). Cela signifie que ce serait la protéine CELSR3 qui se trouve dans l'adénohypophyse qui joue un rôle important lors du développement de cette dernière.

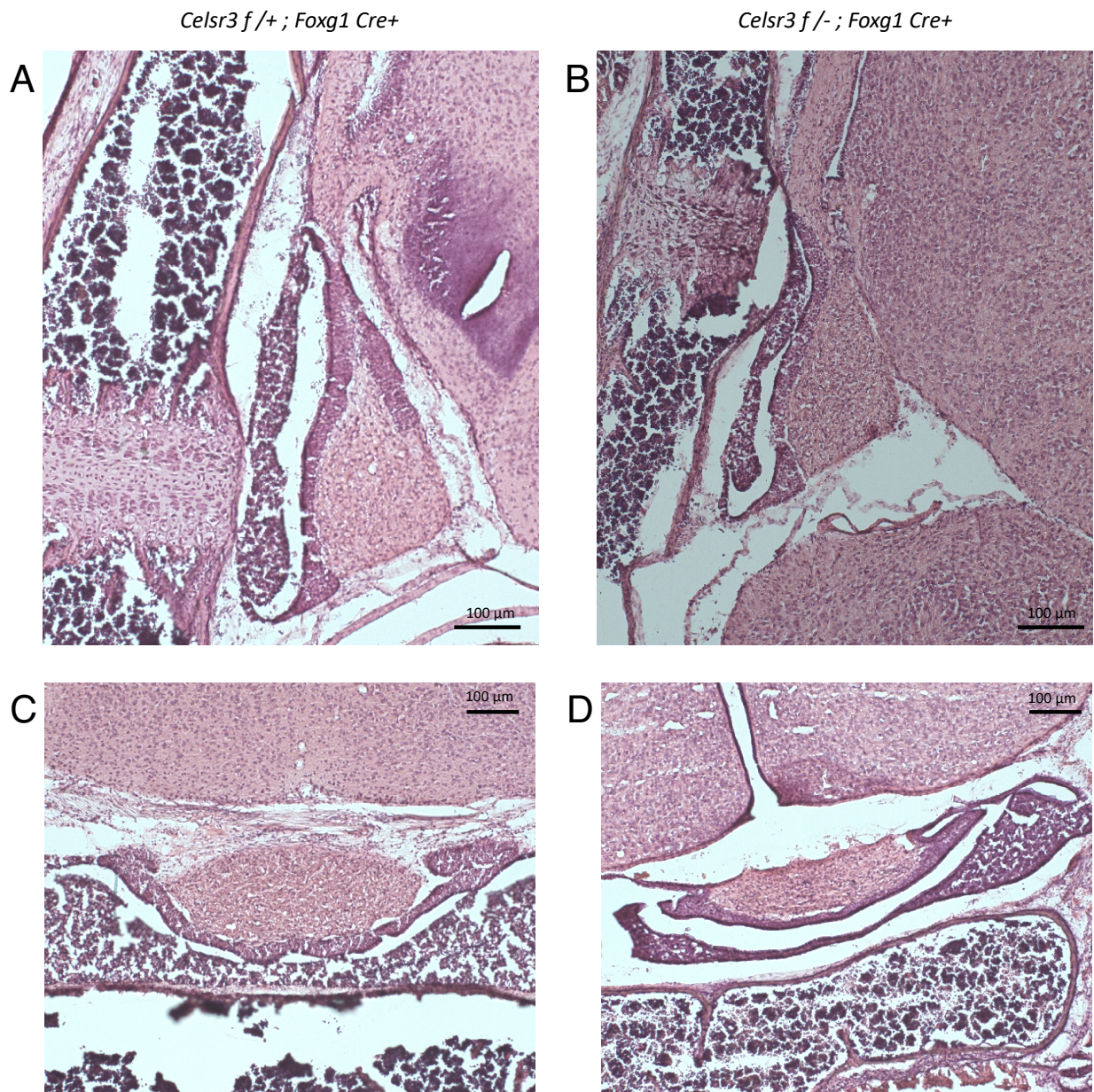


Figure 26: Coupe de la tige pituitaire de souris *Celsr3 f/+ ; Foxg1 Cre+* et *Celsr3 f/- ; Foxg1 Cre+* P15 colorée à l'Hématoxyline-Éosine. (A) Tige pituitaire de souris *Celsr3 f/+ ; Foxg1 Cre+* au jour postnatal 15 en coupe sagittale. (B) Tige pituitaire de souris *Celsr3 f/- ; Foxg1 Cre+* au jour postnatal 15 en coupe sagittale. (C) Tige pituitaire de souris *Celsr3 f/+ ; Foxg1 Cre+* au jour postnatal 15 en coupe coronale. (D) Tige pituitaire de souris *Celsr3 f/- ; Foxg1 Cre+* au jour postnatal 15 en coupe coronale.

Discussion :

Méthodologie :

Afin de réaliser les tests cognitifs, les physio-cages, les mesures urinaires et les Elisias, nous avons utilisé des souris qui avaient entre 6 mois et un an et demi. De plus, pour les deux premiers tests, nous avons utilisé aussi bien des souris femelles que mâles. Par conséquent, comme l'âge et le sexe sont deux biais potentiels qui pourraient influencer les résultats, je propose que nous refassions ces différents tests uniquement sur des mâles d'environ 2 mois. De plus, le nombre d'animaux utilisés afin de réaliser les Elisias ne me semble pas assez important (7 WT VS. 9 KI/KI ou 3WT VS. 5 KI/KI pour la cholécystokinine) et devrait être augmenté au nombre de 10 contrôles pour 10 mutants. Ce problème est aussi présent pour l'analyse histologique de la tige pituitaire. Car en effet, lors de mon stage, je n'ai eu le temps d'analyser qu'un seul animal de chaque génotype, mais il faudrait analyser au moins 3 animaux différents de chaque génotype.

Au cours de cette année, j'ai effectué des marquages des neurofilaments et de l'ADH sur des cerveaux de souris *Celsr3* KO, *Celsr3* KI/KI, *Celsr3^{Foxg1 cKO}* et leurs contrôles qui n'ont malheureusement pas fonctionné. Le fait que le marquage des neurofilaments n'ait pas marché est dû au fait qu'il ne fonctionne pas sur des cerveaux de souris plus âgées que 1 jour postnatal et le marquage de l'ADH n'a pas fonctionné à cause d'une erreur de manipulation de ma part.

Enfin, j'aurais dû compléter le modèle de souris *Celsr3^{Foxg1 cKO}* par un second modèle où *Celsr3* serait délété des noyaux hypothalamiques qui innervent la neurohypophyse (souris *Celsr3^{Sim1 cKO}*) mais les souris n'étaient malheureusement disponibles que sous forme d'embryons ou de sperme congelé chez Jackson Mice (Jax Mice,006395). Par conséquent, je n'ai pas pu observer le rôle de l'expression de *Celsr3* dans les axones innervant la neurohypophyse sur le développement de l'hypophyse.

Résultats :

Comme décrit dans les résultats, les souris possédant la mutation humaine du gène *Celsr3* ne montrent aucun déficit cognitif, aucun problème moteur, aucun problème de poids, aucun problème urinaire, aucun problème morphologique de la tige pituitaire et aucun problème métabolique (si nous mettons les résultats pour l'insuline de côté). Cela signifie que cette mutation chez la souris ne récapitule pas la pathologie humaine qui induit chez l'homme un déficit intellectuel sévère, un retard du développement psychomoteur, des problèmes de croissance et du diabète insipide. Cette différence entre l'homme et la souris est probablement due à leurs métabolismes différents.

Cependant, nous avons remarqués que les souris *Celsr3* KI/KI avaient une concentration plasmatique en insuline plus élevée que les souris contrôles. Cette différence pourrait être expliquée par la présence d'un diabète de type 2 chez les souris *Celsr3* KI/KI. Ce type de diabète touche souvent les adultes en surpoids (Stumvoll, 2005), ce qui pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas vu de différence de poids entre les souris *Celsr3* KI/KI et *Celsr3* WT de moins de 3 mois. En effet, le suivi de poids n'a été réalisé que jusqu'à l'âge de 3 mois et non pas après un an comme pour les mesures en Insuline. De plus, les données préliminaires ont montré une différence de 11g entre une souris *Celsr3* WT (34 g) et *Celsr3* KI/KI (45g) de la même fratrie mais ce après leur un an.

D'un point de vue histologique, nous avons tout d'abord confirmé que l'ARNm de *Celsr3* est bel et bien exprimé dans l'axe hypothalamo-hypophysaire à un stade embryonnaire mais aussi au jour postnatal 0. En effet, l'ARNm de *Celsr3* se trouve à la fois dans l'adénohypophyse et dans l'hypothalamus dont certaines projections axonales donnent la neurohypophyse. Cela explique le fait que nous ayons pu observer une atteinte très importante de l'axe hypothalamo-hypophysaire chez les souris *Celsr3* KO. Cette atteinte est due à une différence d'organisation axonale entre des souris *Celsr3* WT et KO qui pourrait être soit dûe à des problèmes de croissance axonales soit à des problèmes de maintien de ces connexions axonales.

De plus lorsque le gène *Celsr3* est délété de l'adénohypophyse, celle-ci semble plus fine que celle du contrôle comme nous avons pu le constater pour des souris *Celsr3* KO totales. Cela signifie que la délétion de *Celsr3* dans l'adénohypophyse provoque une atteinte morphologique de cette dernière et donc que l'expression de ce gène est nécessaire soit à la croissance soit au

maintien des axones dans la tige pituitaire et dans la neurohypophyse mais aussi au développement de l'adénohypophyse.

Perspectives :

Pour la suite du projet, il serait intéressant de voir si les souris *Celsr3* KI/KI souffrent bel et bien de diabète de type 2 à l'âge adulte et de vérifier si celui-ci est corrélé à une augmentation de leur poids. Pour ce faire, il faudrait refaire un suivi de l'évolution du poids de souris adultes après 1 an, remesurer la concentration plasmatique en Insuline mais aussi mesurer le glucose sanguin des souris à jeun et ayant pris de la nourriture afin de voir quels effets ont la nourriture sur leur métabolisme du glucose. De plus, en fonction des résultats obtenus, il serait judicieux de voir si *Celsr3* est exprimé dans les cellules béta du pancréas ou dans le foie. Afin de réaliser cela, il serait bien d'utiliser l'hybridation in-situ et plus précisément le RNAscope dans le but de détecter l'ARNm codant *Celsr3* car les anticorps servant à détecter cette protéine fonctionnent très mal sur coupe.

Comme décrit dans les résultats, il y a des différences d'organisation axonales entre des souris *Celsr3* WT et KO, qui pourraient être soit dûes à des problèmes de croissance axonale, soit à des problèmes de maintien de ces connexions axonales. Donc pour la suite du projet, il serait intéressant de voir à quel moment du développement ces différences apparaissent afin d'en déterminer la cause. Afin de réaliser cela, il faudrait réaliser à nouveau des marquages des neurofilaments à différents moments du développement embryonnaire. Ensuite, il faudrait aussi localiser les axones et la vasopressine dans le cerveau des souris *Celsr3^{Foxg1 cKO}* à P15, mais cette fois-ci, il vaudrait mieux localiser la myéline et non pas les neurofilaments car nos études des modèles au jour postnatal 15 et que le marquage des neurofilaments ne fonctionne pas à ce stade.

Comme nous savons déjà que l'ARNm de *Celsr3* est présent dans l'hypothalamus et dans l'adénohypophyse, j'aimerais marquer cet ARNm afin de vérifier qu'il soit bien présent dans les noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus. Afin de réaliser cela, nous pourrions utiliser le RNAscope couplé à l'immuno-fluorescence afin de colocaliser respectivement l'ARNm de *Celsr3* et une protéine telle que la vasopressine ou l'ocytocine, qui sont toutes les deux produites par ces deux noyaux (Baribeau and Anagnostou 2015).

Enfin, il serait judicieux d'étudier l'histologie mais aussi le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire sur des souris dont nous délèterions le gène *Celsr3* d'endroits plus spécifiques afin que l'animal survive plus longtemps et que nous puissions évaluer les effets de cette délétion à plus long terme mais aussi voir ses effets sur le métabolisme. C'est pourquoi pour la suite du projet, des souris *Celsr3^{Foxd1 cKO}* et *Celsr3^{Sim1 cKO}* seront utilisées. Chez ces souris, le gène *Celsr3* sera délété respectivement dans les cellules neuro-épithéliales de l'hypothalamus et du pré-thalamus (Newman, Kim et al. 2018) et dans les noyaux paraventriculaires, supra-optiques, postérieurs de l'hypothalamus ainsi que dans le tractus olfactif latéral, l'amygdale médiale et baso-médiale, le noyau du lit de la stria terminalis, le noyau pré-optique médian, et dans les zones hypothalamiques antérieures et latérales, le noyau thalamique ventro-médial et le noyau pré-mammaire ventral et médian, le gris péri-aqueductal ventral, mais aussi dans certaines cellules du rein (Balthasar, Dalgaard et al. 2005)

Références :

- Balthasar, N., et al. (2005). "Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure." Cell **123**(3): 493-505.
- Baribeau, D. A. and E. Anagnostou (2015). "Oxytocin and vasopressin: linking pituitary neuropeptides and their receptors to social neurocircuits." Front Neurosci **9**: 335.
- Crawley Jacqueline N. (2007) What's wrong with my mouse ? behavioural phenotyping of transgenic and knockout mice. Wiley-Interscience
- Formstone, C. J. and P. F. Little (2001). "The flamingo-related mouse Celsr family (Celsr1-3) genes exhibit distinct patterns of expression during embryonic development." Mech Dev **109**(1): 91-94.
- Goffinet, A. M. and F. Tissir (2017). "Seven pass Cadherins CELSR1-3." Semin Cell Dev Biol **69**: 102-110.
- Hadjantonakis, A. K., et al. (1997). "Celsr1, a neural-specific gene encoding an unusual seven-pass transmembrane receptor, maps to mouse chromosome 15 and human chromosome 22qter." Genomics **45**(1): 97-104.
- Luo, L. (2015). "How is eating regulated ?" In: Principles of neurobiologie. (Garland Science), pp356-362.
- Nakayama, M., et al. (1998). "Identification of high-molecular-weight proteins with multiple EGF-like motifs by motif-trap screening." Genomics **51**(1): 27-34.
- Newman, E. A., et al. (2018). "Foxd1 is required for terminal differentiation of anterior hypothalamic neuronal subtypes." Dev Biol **439**(2): 102-111.
- Robertson, G. L. (2016). "Diabetes insipidus: Differential diagnosis and management." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **30**(2): 205-218.

Stumvoll, M., et al. (2005). "Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy." Lancet **365** : 1333-46.

Tissir, F., et al. (2005). "Protocadherin Celsr3 is crucial in axonal tract development." Nat Neurosci **8**(4): 451-457.

Tissir, F., et al. (2002). "Developmental expression profiles of Celsr (Flamingo) genes in the mouse." Mech Dev **112**(1-2): 157-160.

Tissir, F. and A. M. Goffinet (2013). "Atypical cadherins Celsr1-3 and planar cell polarity in vertebrates." Prog Mol Biol Transl Sci **116**: 193-214.

Wray, S. and S. Blackshaw (2020). "Development of the Neuroendocrine Hypothalamus." In "Developmental Neuroendocrinology." (Springer, Editeur), pp3-30.

Zhou, L., et al. (2008). "Early forebrain wiring: genetic dissection using conditional Celsr3 mutant mice." Science **320**(5878): 946-949.

Annexes

Préparation du PBS :

Pour 1 litre,

- 80 g de Chlorure de Sodium
- 2 g de Chlorure de Potassium
- 17,8 g de Di-Sodium Hydrogène Phosphate Dihydrate
- 2,4 g Potassium Dihydrogène Phosphate
- Eau
- pH 7,4

Préparation du tampon sodium citrate :

- 9 ml d'acide citrique 0,1M
- 41 ml de citrate de sodium 0,1M
- 450 ml d'eau
- pH 6

Référence des produits

<u>Produit</u>	<u>Firme</u>	<u>Référence</u>
Aprotinin	Phoenix Pharmaceuticals	RK-APRO
Sample Diluent NS	Abcam	Ab199082
Kit Elisa Ghréline	Phoenix Pharmaceuticals	EK-031-31
Tampon A	Phoenix Pharmaceuticals	RK-BA-1
Colonne de purification	Phoenix Pharmaceuticals	RK-SEPCOL-1
Tampon B	Phoenix Pharmaceuticals	RK-BB-1
Kit Elisa Cholécystokinine	Phoenix Pharmaceuticals	EK-069-04
Kit Elisa Vasopressine	Phoenix Pharmaceuticals	CEK-065-07
Kit Elisa Leptine	Abcam	Ab199082
Kit Elisa Insuline	Crystal Chem	#90080
PFA	Merck	1.04005.1000
Boin	Prosan	33195-0

EDTA	VWR	MOLEM12849293
Sucrose	Sigma	5-9378
O.C.T.	Sciger Scientific Gardena	Ca90248
Toluène	VWR	28701.364
Isopropanol	VWR	20922.364
Hématoxyline	Merck	3863276
Éosine	Merck	15935
Éthanol	VWR	85823.360
H ₂ O ₂	Roth	9683-4
Triton X-100	Sigma	T8787
GS	Sigma	G9023
Neurofilament 2H3	DSHB	AB2314897
Anticorps secondaire Biotinylé	Vector	PK-8800
Streptavidine	Vector	PK-8800
Peroxydase de raifort Biotinylé	Vector	PK-8800
Tris	Roth	EA15.3
HCL	Roth	9277.2
Pastille DAB	Sigma	D5905
DAKO-Pen	Dako	52002
Albumine de sérum bovin	Amresco	0332-5006
Anticorps anti-ADH	Abcam	ab39363
Alexa Fluor Green	Invitrogen	A21206
DAPI	Sigma	D9564
Stylo hydrophobique Immedge	Vector	H-4000
Peroxyde d'hydrogène	ACD	322335
Protéinase IV	ACD	322336
Protéase Plus	ACD	322331
Sonde Celsr3	ACD	319241
Tampon de lavage	ACD	310091
Amplificateurs	ACD	322360
Red A	ACD	322360
Red B	ACD	322360
Mowiol	Merck	81381-250G
Acide citrique monohydrate	Merck	1.002440.500

Sodium citrate	Merck	1.06448.1000
Chlorure de Sodium	Roth	P029.3
Chlorure de Potassium	Merck	1.04936.0500
Di-Sodium Hydrogène Phosphate Dihydrate	Merck	1.06580.1000
Potassium Dihydrogène Phosphate	Merck	1.04873.1000

Abstract

The *CELSR3* gene is crucial for axonal guidance and brain wiring. Studies of loss of function in mice have demonstrated an important role of this gene in directed axon growth, synapse formation and brain connectivity. In humans, a false sense mutation in the *CELSR3* gene (9355 A>G) is associated with severe intellectual deficit, delayed language and psychomotor development and diabetes insipidus. An analysis of neuronal connections by MRI imaging did not reveal any severe abnormality, suggesting that the mutation induces only subtle guidance and connectivity deficits. Therefore, we studied an animal model of this mutation from a cognitive, metabolic and histological point of view. We performed 3 cognitive tests including the Open Field, the Y maze and the Morris Pool which allowed us to compare the behavior of *Celrs3* KI/KI and *Celrs3* WT mice of the same litter. The results of these tests showed no differences between mutant and control mice in memory, learning, anxiety or locomotion. Then, we performed metabolic tests, the mice were put for 24 hours in physio-cages that allow us to evaluate water and food consumption but also activity. And as with the cognitive tests, there was no difference between control and mutant mice in this test. Next, we analyzed urine volume and osmolarity but found no difference between *Celrs3* KI/KI and *Celrs3* WT mice suggesting that the human mutation does not induce diabetes insipidus in mice. Subsequently, we followed the evolution of the weight of *Celrs3* KI/KI mice and their WT counterparts over the weeks. But no significant difference in weight was measured between the two types of mice. In addition to weight analysis, we performed Elisa to measure the plasma concentration of the different hormones involved in the hunger control circuit. For Leptin, Cholecystokinin and Ghrelin, there was no difference in plasma concentration between *Celrs3* KI/KI and *Celrs3* WT mice. However, we observed that the Insulin plasma concentration is higher in mice with the human mutation. Finally, from a histological point of view, we found no abnormalities in *Celrs3* KI/KI mice confirming that these mice do not show the same pathological phenotype as humans. However, in mice with a deleted *Celrs3* gene, we observed a difference in axonal organization which could be either due to problems in axonal growth or problems in maintaining these connections.

