

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 octobre 2015 (15.10.2015)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/155490 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A01K 67/027 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/050981

(22) Date de dépôt international :
13 avril 2015 (13.04.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1453268 11 avril 2014 (11.04.2014) FR

(71) Déposant : CENTRE NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3 rue
Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs : RUAT, Martial; 16 rue du Bois du Roi, F-
91400 Orsay (FR). TRAIFFORT, Elisabeth; 26 place
Jeanne d'Arc, F-75013 Paris (FR). FERENT, Julien; 1732
rue Alexandre De Sève, Montreal, Québec H2L2V9 CA-
NADA (CA).

(74) Mandataire : MONNI, Richard; 11 boulevard de Sébas-
topol, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,

BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des sé-
quences (règle 5.2.a))

(54) Title : ANIMAL MODEL HAVING A FUNCTION KNOCKOUT OF THE GENE CODING FOR THE MEMBRANE RE-
CEPTOR PATCHED OR PTC

(54) Titre : MODÈLE ANIMAL PRÉSENTANT UNE INVALIDATION FONCTIONNELLE DU GÈNE CODANT POUR LE
RÉCEPTEUR MEMBRANAIRE PATCHED OU PTC

(57) Abstract : The invention relates to a transgenic non-human mammal having a functional knockout of the gene coding for the
membrane receptor Patched or Ptc, and having a lighter total mass than the transgenic wild-type mammal.

(57) Abrégé : L'invention concerne un mammifère transgénique non humain, présentant une invalidation fonctionnelle du gène co-
dant le récepteur membranaire patched ou Ptc, et présentant une réduction de sa masse totale par rapport audit mammifère transgé-
nique sauvage.



WO 2015/155490 A1

MODÈLE ANIMAL PRÉSENTANT UNE INVALIDATION FONCTIONNELLE DU GÈNE
CODANT POUR LE RÉCEPTEUR MEMBRANAIRE PATCHED OU PTC

L'invention concerne un modèle animal et ses utilisations.

La molécule de signalisation Hedgehog (Hh) appartient à une famille de morphogènes (Ingham et al. 2001, Dev Biol, 330(2) ; 3059-87) comprenant trois membres (Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog et Indian Hedgehog) homologues au produit du gène de polarité segmentaire Hh chez la drosophile. Shh est synthétisé sous la forme d'un précurseur qui subit une série de modifications post-traductionnelles au cours desquelles la protéine est clivée par une activité enzymatique présente dans sa partie C-terminale. Cette autoprotéolyse génère un fragment C-terminal (ShhC) et le fragment N-terminal biologiquement actif (ShhN). Ce dernier est modifié par l'addition d'une molécule de cholestérol en C-terminal et d'une molécule d'acide gras sur le résidu cystéine N-terminal déprotégé après l'élimination du peptide signal (Varjosalo et al. 2008). La sécrétion de la protéine ShhN dépend de son interaction avec d'autres protéines. C'est le cas de la protéine Dispatched qui s'apparente à la famille des transporteurs possédant un domaine senseur de stéroïls, mais aussi des composantes de la matrice extracellulaire telles que les héparanes sulfates protéoglycanes. La formation de formes oligomériques de ShhN ou le relargage de la molécule par protéolyse de ses deux extrémités ont aussi été proposés. ShhN transmet son action par l'intermédiaire d'un complexe contenant deux protéines transmembranaires: Patched (Ptc) une protéine à 12 domaines transmembranaires (TM) présentant une structure de type transporteur et Smoothened (Smo) une protéine à 7 domaines TM aux membres de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). En l'absence de son ligand Shh, Ptc inhibe Smo par un mécanisme qui reste encore hypothétique, mais qui est vraisemblablement de nature catalytique et fait intervenir une potentielle activité de Ptc dans le transport de molécules lipidiques membranaires. La cascade intracellulaire consécutive à la fixation de Shh sur Ptc et la levée de l'inhibition exercée par Ptc sur Smo s'accompagnent de l'accumulation de Smo dans une organelle spécifique, le cil primaire. De nombreux facteurs intracellulaires dont les protéines Suppressor of Fused (SuFu) et PKA, mais aussi les facteurs de transcription Gli sont également transloqués dans le cil. Cet adressage au cil est nécessaire à la conversion des facteurs Gli en formes activatrices qui conduiront à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles tels que *Ptc* et *Gli 1*.

Le rôle régulateur de la voie de signalisation des protéines Hedgehog durant le développement embryonnaire a été largement étudié. Hh a été associé aux processus de maintien et de réparation du tissu normal, à la régulation spatiotemporelle de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Le morphogène a notamment été impliqué dans le développement du système nerveux central. Le rôle essentiel de la

signalisation Hh est attesté par les conséquences dramatiques d'une signalisation Hh déficitaire chez le fœtus humain observées dans le syndrome de l'holoprosencéphalie. Plus récemment, la voie Shh a été identifiée dans le cerveau adulte, où la forme active aminoterminal de la molécule est exprimée dans de nombreuses régions du système nerveux mature suggérant de nouveaux rôles pour cette voie. Celle-ci participe notamment à l'établissement et au maintien des niches neurogéniques. Shh régule la prolifération des précurseurs oligodendrocytaires dans le cerveau non lésé et constitue un régulateur positif des oligodendrocytes au cours de la réparation du tissu cérébral démyélinisé. La modulation de la voie de signalisation Shh représente donc un enjeu dans la thérapeutique des pathologies démyélinisantes telles que la sclérose en plaques, mais aussi d'autres maladies neurodégénératives. Pour la maladie de Parkinson et à un moindre degré pour la maladie d'Alzheimer, ces hypothèses reposent sur les activités de survie et de différenciation induites par Shh seul ou en présence d'autres facteurs de croissance. Shh est aussi capable de réduire *in vitro* l'activité électrique des neurones du noyau subthalamique impliqués dans la maladie de Parkinson. Enfin, des études ont mis en évidence les effets positifs de l'activation de la voie par la protéine Shh elle-même, sur les troubles comportementaux observés dans un modèle de cette même pathologie.

Il existe donc un besoin d'étudier la voie de signalisation Shh afin de pouvoir déterminer, directement chez l'animal, son implication dans les pathologies susmentionnées.

Des dysfonctionnements de la voie de signalisation Shh ont également été associés à de nombreux cancers. En effet, des mutations inactivatrices de Ptc sont associées au syndrome de Gorlin ou naevomatose basocellulaire, une maladie autosomale dominante caractérisée par des malformations cranofaciales et cérébrales, mais surtout par l'incidence élevée de diverses tumeurs, plus particulièrement des carcinomes basocellulaires au niveau cutané et des médulloblastomes au niveau cérébral. Des formes sporadiques de médulloblastomes et de carcinomes basocellulaires ont aussi été associées à des mutations des gènes Ptc ou Smo humains. Des mutations de Shh ont également été identifiées dans des carcinomes basocellulaires. D'autres types de tumeurs ont aussi été associés à un défaut de la voie de signalisation Hh. La localisation de ces tumeurs est étroitement corrélée aux sites d'expression des composantes de la voie au cours du développement embryonnaire. A titre d'exemple non-limitatif on peut citer: des cancers du sein et des méningiomes associés à des mutations de Ptc, des glioblastomes associés à des mutations de Gli, des cancers gastro-intestinaux, notamment des cancers primaires de l'estomac et du colon, des cancers de la prostate, de la vessie, de l'ovaire, les rhabdomyosarcomes, les cancers

du poumon à petites cellules.

Toutefois, ces modèles concernent un gène *Ptc* muté et ne permettent pas d'étudier *in vivo* la fonction du gène *Ptc* sauvage.

On connaît de l'état de la technique des modèles animaux d'inactivation de *Ptc*.

- 5 Par exemple, la demande internationale WO 99/61582 enseigne des animaux transgéniques *Ptc*^{-/-}. Ces animaux meurent au stade embryonnaire du fait d'un défaut de fermeture du tube neural et pour des raisons de malformation cardiaque.

Aussi, la question de la fonction de *Ptc* dans le cerveau, notamment chez les animaux adultes, demeure irrésolue.

- 10 Un des objets de l'invention est d'obvier à ces inconvénients en proposant des animaux modèles permettant d'étudier *in vivo* la fonction de *Ptc* sauvage, notamment dans le cerveau.

Un autre objet de l'invention est de proposer une méthode d'inactivation du gène *Ptc* permettant de contrôler dans l'espace et dans le temps l'expression dudit gène.

- 15 L'invention concerne un mammifère transgénique non humain, présentant une inactivation fonctionnelle biallélique du gène codant le récepteur membranaire patched ou *Ptc* dans les cellules souches neurales et/ou dans les cellules gliales, ledit mammifère ayant une masse corporelle totale au moins 30% inférieure à la masse corporelle total dudit mammifère transgénique ne présentant pas d'inactivation
- 20 fonctionnelle dudit gène codant le récepteur membranaire *Ptc* dans lesdites cellules souches neurales et/ou dans lesdites cellules gliales, ledit mammifère ayant un génotype sauvage pour le gène *Ptc*, à l'exception des cellules souches neurales et/ou des cellules gliales qui ont un génotype *Ptc*^{-/-}.

Les inventeurs ont conçu un modèle animal présentant une inactivation du gène

- 25 *Patched* spécifique dans certaines cellules, en mettant à profit les techniques de transgénèse et de croisement sexuels d'animaux.

L'invention repose sur la constatation surprenante faite par les inventeurs que les animaux adultes invalidés pour le gène *Patched* (*Ptc*) ne développent pas de tumeurs et ont une masse réduite. Un exemple de réduction de la masse de souris

- 30 transgéniques selon l'invention est donné à titre illustratif ci-après.

Par ailleurs, les inventeurs ont également fait la constatation inattendue que la délétion, ou l'inactivation fonctionnelle, du gène *Ptc* avait pour conséquence d'inhiber la différenciation des cellules souches et ainsi d'augmenter leur nombre. Il y a donc un enrichissement en cellules souches neurales chez les animaux présentant l'inactivation

- 35 fonctionnelle de *Ptc* dans les cellules souches neurales et les cellules gliales.

Une telle réduction de la masse est observée lorsque le gène *Ptc* est invalidé dans les cellules souches neurales ou les cellules gliales, ou en d'autre terme dans les cellules

exprimant le marqueur Glast.

Par « génotype sauvage pour le gène Ptc », on entend dans l'invention le fait que le gène Ptc est exprimé normalement. Cela signifie donc que le gène Ptc est non modifié, ou que le gène a été modifié, par exemple en y insérant des séquences exogènes, ou en introduisant des mutations, qui n'affectent ni l'expression du gène, ni la fonction du produit, c'est-à-dire la fonction du récepteur Ptc. Un exemple de génotype sauvage serait une insertion de part et d'autre du gène Ptc de séquences de recombinaisons de type Lox. Ces séquences ont modifié la séquence génique du gène, mais n'affectent, avant recombinaison, ni l'expression du gène, ni la fonction du récepteur.

- Avantageusement, l'invention concerne un mammifère transgénique non humain adulte, présentant une invalidation fonctionnelle biallélique du gène codant le récepteur membranaire patched ou Ptc dans les cellules souches neurales et/ou dans les cellules gliales, ledit mammifère ayant une masse corporelle totale au moins 30% inférieure à la masse corporelle total dudit mammifère transgénique ne présentant pas d'invalidation fonctionnelle dudit gène codant le récepteur membranaire Ptc dans lesdites cellules souches neurales et/ou dans lesdites cellules gliales.

- Dans l'invention, on entend par « invalidation fonctionnelle » toute action génétique ou épigénétique permettant d'inhiber l'expression d'un ou plusieurs gènes ou ayant pour effet de rendre le produit d'un gène dépourvu de son activité. Généralement, l'invalidation fonctionnelle passe par la délétion totale ou partielle d'une ou plusieurs séquences codantes d'un gène ayant pour effet d'inhiber l'expression du produit dudit gène, ou de permettre l'expression d'un produit ne présentant plus ses propriétés biologiques (perte ou modification d'activité enzymatique, perte ou modification de sa conformation tridimensionnelle...). La délétion de gènes chez les animaux passe généralement par la technique de « Knock-out » qui consiste à exciser tout ou partie d'un gène (en particulier la délétion d'un ou plusieurs exons) en vue d'en supprimer son expression ou de supprimer l'activité de la protéine qu'il code.

- Il est également possible d'utiliser des techniques de « Knock-in » qui consistent à introduire de manière ciblée un élément génétique dans un gène déterminé afin soit d'en inhiber l'expression, soit de modifier le cadre de lecture, de sorte que le produit dudit gène est alors non fonctionnel.

- Dans l'invention, l'invalidation fonctionnelle est dite biallélique, ce qui signifie que les deux copies du gène Ptc sont invalidées. Les animaux transgéniques non humains de l'invention sont donc homozygotes pour la délétion du gène Ptc dans les cellules souches neurales et/ou les cellules souches gliales. En outre, il est important de rappeler que l'invention ne concerne pas des animaux transgéniques non humains hétérozygotes pour le gène Ptc, c'est à dire des animaux de génotype Ptc^{+/-}, en

particulier des animaux dont le génotype des cellules souches neurales et/ou gliales est $Ptc^{+/-}$.

D'autres techniques d'invalidation sont bien connues de l'homme du métier, comme par exemple la mutagenèse aléatoire utilisant des agents chimiques modifiant l'ADN.

- 5 Comme mentionné ci-dessus, l'invention concerne avantageusement « un mammifère transgénique non humain adulte ».

Par animal transgénique, on entend dans l'invention un animal génétiquement modifié dont le patrimoine génétique a été modifié par l'homme. Bien évidemment dans le contexte de l'invention, les mammifères transgéniques ne concernent pas les humains.

- 10 Par « un mammifère transgénique non humain adulte » on entend dans l'invention un mammifère biologiquement stable ayant acquis sa maturité sexuelle et donc susceptible de se reproduire, s'il est fertile.

- Le mammifère selon l'invention est notamment un rongeur, notamment un rat ou une souris, ou un animal de laboratoire (chien, chat, singe, lapin, hamster...). Plus
15 particulièrement, le mammifère transgénique selon l'invention est un rongeur, notamment une souris.

- L'homme du métier, selon le mammifère considéré, est capable de déterminer aisément si l'animal a acquis le statut d'adulte. Par exemple, dans le cas de souris, les animaux adultes ont plus de 6 semaines notamment plus de 8 semaines. En d'autres termes,
20 chez la souris, les animaux de plus de 6 à 8 semaines sont considérés comme adultes.

- Dans un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne un mammifère transgénique non humain tel que défini précédemment, où lesdites cellules souches neurales et/ou lesdites cellules gliales sont des cellules exprimant le gène neural *Glast*.

- Dans l'invention, les animaux n'exprimant plus de récepteur Patched dans les cellules
25 souches neurales ou les cellules gliales, ou encore exprimant une forme non fonctionnelle du gène Patched, présentent une masse réduite d'au moins 30% inférieure par rapport au même animal exprimant le gène Patched dans lesdites cellules souches neurales et les cellules gliales. Par « au moins 30% inférieur » on entend dans l'invention au moins 30%, au moins 31 %, au moins 32 %, au moins 33
30 %, au moins 34 %, au moins 35 %, au moins 36 %, au moins 37 %, au moins 38 %, au moins 39 %, au moins 40 %, au moins 41 %, au moins 42 %, au moins 43 %, au moins 44 %, au moins 45 %, au moins 46 %, au moins 47 %, au moins 48 %, au moins 49 % ou au moins 50 %. Plus avantageusement, les animaux n'exprimant plus de récepteur Patched dans les cellules souches neurales ou les cellules gliales, ou encore exprimant
35 une forme non fonctionnelle du gène Patched, présentent une masse réduite de 30% à 40% inférieure par rapport au même animal exprimant le gène Patched dans lesdites cellules souches neurales et les cellules gliales.

Avantageusement, l'invention concerne un mammifère transgénique non humain, présentant une invalidation fonctionnelle du gène codant le récepteur membranaire patched ou Ptc dans les cellules souches neurales et/ou dans les cellules gliales, ledit mammifère ayant une masse corporelle totale au moins 30%, mais au plus de 40%,
5 inférieure à la masse corporelle total dudit mammifère transgénique ne présentant pas d'invalidation fonctionnelle dudit gène codant le récepteur membranaire Ptc dans lesdites cellules souches neurales et/ou dans lesdites cellules gliales.

Les cellules souches neurales sont des cellules souches multipotentes, capables de s'auto-renouveler, dont le potentiel de différenciation est restreint aux types cellulaires
10 neuraux, notamment : les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes.

Durant l'embryogenèse, ces cellules souches neurales sont situées dans la zone ventriculaire du tube neural. Elles génèrent l'ensemble des types cellulaires nécessaires au système nerveux central (à l'exception de la microglie), par un processus appelé neurogenèse.

15 Dans le système nerveux, les cellules gliales sont les cellules qui forment l'environnement des neurones. Elles assurent le maintien de l'homéostasie, produisent la myéline et jouent un rôle de soutien et de protection du tissu nerveux en apportant les nutriments et l'oxygène, en éliminant les cellules mortes et en combattant les pathogènes. Les cellules gliales représentent environ 50% du volume cérébral¹ et
20 presque 90 % des cellules du cerveau. On distingue en général 4 principaux types de cellules gliales : les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann et la microglie.

Glast (pour GLutamate ASpartate Transporter en anglais) aussi appelé EAAT1 (pour Excitatory Amino Acid Transporter 1 en anglais) est une protéine exprimée de manière
25 prédominante à la membrane cellulaire et permettant d'épurer le glutamate de l'espace extracellulaire. Glast est exprimé dans le système nerveux central et en particulier dans les astrocytes.

De manière plus avantageuse, l'invention concerne un mammifère transgénique non humain tel que défini précédemment, où lesdites cellules gliales sont des cellules
30 exprimant le gène neural *Glast*, et notamment des cellules astrocytaires.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne un mammifère transgénique tel que défini ci-dessus, ledit mammifère ayant un génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*, à l'exception des cellules souches neurales et des cellules souches gliales qui ont un génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{-/-}*.

35 Afin de réaliser l'invalidation fonctionnelle de Ptc, les inventeurs ont tiré profit du système d'invalidation basé sur la recombinaise Cre et sa capacité à exciser des séquences nucléiques comprises entre les séquences cibles LoxP.

De plus, afin de réaliser une invalidation spécifique, les inventeurs ont mis à profit l'utilisation d'une recombinaise Cre inducible : la CreERT2.

La recombinaise CreERT2 - permettant le contrôle spatio-temporel de la mutagenèse somatique - est devenue ces dernières années la référence technologique pour l'étude *in vivo* des mécanismes d'action et de l'expression des gènes, par une excision contrôlée d'acides nucléiques compris entre les séquences LoxP. La CreERT2 est une fusion entre la recombinaise Cre et le domaine de liaison au ligand du récepteur aux oestrogènes.

Le contrôle spatial des modifications génétiques nécessite l'emploi d'un promoteur spécifique de tissu qui contrôle l'expression de la recombinaise Cre. Pour obtenir un contrôle temporel de la suppression réalisée par la recombinaise Cre, l'enzyme a été fusionnée à un nouveau domaine de liaison à l'ADN muté du récepteur humain aux oestrogènes (ERT2). Sous sa forme non liée à un ligand, la CreERT2 ne possède aucune activité recombinaise, et n'est donc pas capable d'exciser des acides nucléiques compris entre des séquences LoxP. Suite à l'administration du tamoxifène (un antagoniste aux récepteurs aux estrogènes), la protéine fusion Cre ERT2 est capable de pénétrer dans le noyau cellulaire et de créer la modification génétique. ERT2 se lie au tamoxifène mais pas aux œstrogènes endogènes ce qui permet à la protéine fusion CreERT2 de rester cytoplasmique chez les animaux non traités avec du tamoxifène. Le contrôle temporel par le tamoxifène permet de créer les modifications génétiques à un moment précis du développement, à un temps défini par l'homme du métier.

Dans le cadre de l'invention, afin de cibler spécifiquement l'invalidation de Patched dans les cellules souches neurales et les cellules gliales, et notamment astrocytaires, les inventeurs ont utilisé une CreERT2 placée sous contrôle du promoteur du gène Glaxt (aussi appelé dans l'invention promoteur Glaxt), dont le produit d'expression est retrouvé dans les lesdites cellules souches neurales et gliales.

Au final, tel que décrit dans la partie expérimentale ci-après, les inventeurs ont mis à profit le croisement de souris transgéniques pour le gène Ptc, bordé de séquences LoxP, de génotype Ptc^{fl/fl}, avec des souris transgéniques ayant inséré au locus Glaxt le gène de la recombinaise Cre inducible au tamoxifène, de génotype. Glaxt-CreERT2. Après croisement, la descendance est sélectionnée de sorte que les animaux possèdent les deux types de transgènes : Glaxt-CreERT2 et Ptc^{fl/fl}. Le génotype de ces animaux est donc Glaxt-CreERT2 ; Ptc^{fl/fl}.

Avant traitement au tamoxifène, l'ensemble des cellules des animaux issus des croisements précédents sont de génotype Glaxt-CreERT2 ; Ptc^{fl/fl}. Après traitement au tamoxifène, les cellules qui n'expriment pas le gène Glaxt n'exprimeront pas la

recombinase Cre. Aussi, dans ces cellules il n'y aura pas d'invalidation de du gène Ptc. Ces cellules demeureront de génotype Glaxt-CreERT2 ; Ptc^{fl/fl}.

Dans les cellules souches neurales et les cellules gliales, notamment astrocytaires, le gène Glaxt s'exprime. Aussi, la recombinaise Cre CreERT2 s'exprime également et est
5 activable par le tamoxifène. Ces cellules auront donc une invalidation du gène Ptc, et seront de génotype Glaxt-CreERT2;Ptc^{-/-}.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne un animal transgénique tel que défini précédemment, ledit mammifère ayant un génotype Glaxt-CreERT2;Ptc^{fl/fl}, à l'exception des cellules souches neurales et des cellules souches gliales qui ont un
10 génotype Glaxt-CreERT2;Ptc^{-/-} et expriment un ou plusieurs marqueurs permettant qui n'est pas exprimé dans les autres cellules, notamment les cellules exprimant ledit récepteur Ptc.

Afin de suivre la recombinaison par la recombinaise Cre, il peut être avantageux de disposer d'animaux transgéniques susmentionnés possédant également un ou
15 plusieurs transgènes inductibles qui seront exprimés ou activés lorsque la recombinaise Cre sera activée par le tamoxifène.

Un exemple de marqueur avantageux est un transgène codant la protéine fluorescente jaune (YFP) possédant un codon stop entouré de séquences LoxP. Ce transgène peut être placé sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire, en particulier le promoteur du
20 gène ROSA26. De tels animaux sont connus de l'homme du métier. Par exemple, chez la souris, les animaux possédant ladite protéine YFP recombinante inductible par la recombinaise Cre sont notamment les souris B6.129X1-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(EYFP)Cos/+} disponibles sous le numéro 006148 au Jackson Laboratory.

Le mammifère selon l'invention a un génotype Glaxt-CreERT2;Ptc^{fl/fl}, R26R-YFP/+, et
25 les cellules expriment Ptc mais n'expriment pas la protéine fluorescente jaune ou YFP, tandis que les cellules souches neurales et des cellules souches gliales n'expriment plus Ptc mais expriment la YFP.

Un tel animal transgénique permet de suivre l'expression de la recombinaise Cre de d'identifier les cellules dans lesquelles la recombinaison s'est produite. Il est également
30 possible de suivre la descendance des cellules ayant subi la recombinaison, et plus largement suivre l'évolution, *in vivo*, des cellules recombinées au cours du développement ou de la vie adulte de l'animal.

Dans encore un autre mode de réalisation, l'invention concerne un mammifère transgénique tel que défini précédemment, où malgré la réduction de la masse corporelle totale dudit mammifère, ledit mammifère présente un cerveau
35 essentiellement similaire à celui dudit mammifère transgénique ne présentant pas d'invalidation fonctionnelle dudit gène codant le récepteur membranaire Ptc dans

lesdites cellules souches neurales et/ou dans lesdites cellules gliales.

Les inventeurs ont constaté que l'invalidation fonctionnelle de Ptc dans les cellules souches neurales et dans les cellules gliales, notamment les cellules astrocytaires, avait pour conséquence de réduire la masse totale des animaux. Toutefois, et de
5 manière surprenante, la masse globale du cerveau des animaux transgéniques, notamment adultes, selon l'invention n'est pas différente des animaux témoins qui n'ont pas d'invalidation fonctionnelle de Ptc dans les cellules souches neurales et les cellules gliales.

Par « essentiellement similaire », on entend dans l'invention une similitude non exacte
10 qui peut être due à la variabilité individuelle des animaux. On peut considérer que deux cerveaux ont des masses essentiellement similaires s'ils ont à plus ou moins cinq pourcents près la même masse.

Ce qui est notable, comme cela a été indiqué précédemment, c'est que le cerveau des animaux transgéniques selon l'invention est enrichi en cellules souches neurales par
15 rapport aux animaux ne présentant pas d'invalidation du gène Ptc.

L'invention concerne également une cellule isolée de génotype $\text{Glast-CreERT2;Ptc}^{-/-}$.

L'invention concerne en outre des cellules susmentionnées, lesdites cellules atant des cellules souches neurales ou des cellules gliales.

Les cellules $\text{Glast-CreERT2;Ptc}^{-/-}$ sont nouvelles. Ces cellules sont en particulier des
20 cellules souches neurales de génotype $\text{Glast-CreERT2;Ptc}^{-/-}$. Ces cellules peuvent être isolées des animaux transgéniques tels que définis précédemment.

Aussi, avantageusement, l'invention concerne une cellule isolée de génotype $\text{Glast-CreERT2;Ptc}^{-/-}$ susceptible d'être obtenue à partir de l'animal transgénique susmentionné.

25 Il peut également s'agir de cellules souches gliales, notamment des astrocytes de génotype $\text{Glast-CreERT2;Ptc}^{-/-}$ obtenus à partir des animaux transgéniques selon l'invention.

Dans le cadre des cellules souches neurales issues des animaux transgéniques selon l'invention, il est possible de les isoler et de les purifier selon le protocole défini par
30 Daynac et al. (Daynac et al., Stem Cell Research (2013) 11, 516–528). Brièvement, les cerveaux des animaux sont micro disséqués et les cellules sont dissociées à l'aide d'une pipette. Les cellules sont ensuite marquées avec des anticorps dirigés contre des antigènes de surface spécifiques des cellules souches neurale. Pour la souris, les cellules sont marquées avec les anticorps anti-CD124, anti-LeX/CD15, anti-Glast et anti
35 EGFR. Si les marqueurs susmentionnés sont couplés, directement ou indirectement avec des marqueurs fluorescents, il est possible d'isoler les cellules souches neurales par cytométrie de flux et tri cellulaire. Cette méthode permettra de détecter parmi une

population hétérogène les cellules qui présentent les marqueurs appropriés. L'homme du métier connaît très bien ces méthodes de cytométrie.

L'invention concerne en outre un mammifère transgénique non humain présentant le génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*.

- 5 Les mammifères transgéniques *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}* sont les mammifères issus du croisement de souris *Glast-CreERT2* et de souris *Ptc^{fl/fl}*. Ces mammifères sont les prérequis pour obtenir une invalidation spécifique de tissus du gène *Ptc*, et notamment une invalidation dans les cellules souches neurales et les cellules gliales.

- 10 L'invention concerne en outre une cellule isolée de génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*, cette cellule est notamment susceptible d'être obtenue à partir du mammifère transgénique tel que défini ci-dessus.

Avantageusement, le mammifère transgénique susmentionné est de génotype *Glast-Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}* ou de génotype *CreERT2;Ptc^{fl/fl}, R26R-YFP/+*.

- 15 L'invention concerne de plus l'utilisation du tamoxifène pour l'invalidation, notamment *in vitro*, du gène *Ptc* dans des cellules de mammifères de génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*.

L'invention concerne également l'utilisation de tamoxifène pour l'obtention d'un mammifère transgénique tel que défini précédemment.

L'invention concerne également l'utilisation *in vitro* du tamoxifène pour l'invalidation du gène *Ptc* dans des cellules de mammifères de génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*.

- 20 L'utilisation de tamoxifène a pour effet d'induire l'expression de la recombinaise *Cre CreERT2*, et de permettre la délétion des séquences du gène *Ptc* comprises entre les séquences *LoxP*.

- 25 Aussi, *in vitro* ou *in vivo*, il est possible d'invalider spécifiquement le gène *Ptc* dans les cellules souches neurales et/ou les cellules gliales, notamment les cellules astrocytaires. L'utilisation de tamoxifène permet également d'induire *in vivo* la délétion de *Ptc* dans les cellules souches neurales et les cellules gliales, dans des mammifères *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*, et d'obtenir ainsi des mammifères de génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*, ayant des cellules souches neurales et/ou des cellules souches gliales, notamment astrocytaires de génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{-/-}*.

- 30 Le tamoxifène est utilisé dans le cadre de l'invention à une dose de 0,1mg à 10 mg, notamment 1mg en une ou plusieurs injections lorsqu'il s'agit de traiter un animal transgénique, ou directement dans le milieu de culture lorsqu'il s'agit de cellules en culture.

- 35 Dans le cadre d'animaux, et d'une utilisation *in vivo*, le tamoxifène peut être administré par voie intrapéritonéale, mais également par voie sous-cutanée, par voie intracrânienne, par voie transdermale ou toute autre mode d'administration bien connu de l'homme du métier.

Toujours dans le cadre d'une administration chez l'animal, le tamoxifène peut être administré en une ou plusieurs doses séparées dans le temps. Un régime posologique avantageux consiste en une administration quotidienne pendant 3 à 7 jours consécutifs, notamment 5 jours consécutifs.

- 5 L'invention concerne également l'utilisation d'un mammifère transgénique tel que défini précédemment, pour purifier des cellules souches neurales.

Comme il déjà été mentionné plus haut, l'inactivation de *Ptc* a pour effet notamment d'inhiber la différenciation des cellules souches neurales. Ces cellules souches neurales vont donc s'accumuler et seront donc plus facilement identifiable et purifiable. Aussi, le

10 mammifère transgénique tel que défini précédemment est très utile pour obtenir une plus grande population de cellules souches neurales comparé à un mammifère n'ayant pas d'inactivation du gène *Ptc*.

- L'invention concerne également une méthode d'inhibition de la différenciation des cellules souches neurales, notamment *in vitro*, comprenant une étape de mise en
- 15 contact de cellules souches neurales préalablement obtenues à partir d'un mammifère transgénique non humain présentant le génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}* avec du tamoxifène.

- Comme mentionné précédemment, l'induction de la *CreERT2* a pour effet d'inhiber la différenciation des cellules souches neurales de génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*. Aussi,
- 20 si l'on met en contact les cellules souches neurales, qui ont préalablement été isolées d'un animal transgénique tel que défini précédemment, il est possible d'inhiber leur différenciation en les incubant avec une dose efficace de tamoxifène.

Les cellules vont alors exprimer la recombinaise *CreERT2* et ainsi perdre l'expression du gène *Ptc*.

- 25 Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation du tamoxifène pour induire le blocage de la différenciation, en particulier *in vitro*, de cellules souches neurales ou de cellules gliales, lesdites cellules souches et cellules neurales présentant un génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{-/-}*.

- L'invention concerne en outre une méthode de modulation, notamment *in vitro*, de
- 30 l'expression du gène *Ptc* dans des cellules souches neurales ou dans des cellules gliales, notamment des cellules souches isolées, ladite méthode comprenant une étape de mise en contact desdites cellules souches neurales ou desdites cellules gliales avec une dose efficace de tamoxifène, lesdites cellules souches neurales et/ou gliales présentant un génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*.

- 35 D'autres aspects peuvent se dégager de l'invention telle qu'elle est exposée ci-dessus. En effet, les inventeurs ont pu réaliser une inactivation du gène *Ptc* dans des cellules spécifiques, et disposent donc d'un excellent modèle pour étudier la voie de

signalisation Hh dans ces cellules.

On peut ainsi envisager l'utilisation du mammifère transgénique selon l'invention en tant que modèle d'étude de la voie Hh. Par exemple il est possible d'utiliser ce modèle en réintroduisant dans les cellules $Ptc^{-/-}$ un ou plusieurs effecteurs du récepteur Ptc afin de

5 disséquer le mécanisme de la voie Hh.

La voie Hh étant également impliquée dans différentes pathologies, le modèle animal créé par les inventeurs et objet de la présente invention permet également de décrypter les mécanismes de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaques,...

10 Un autre aspect qui se dégage de l'invention est le blocage de la différenciation des cellules souches neurales. Le mammifère transgénique selon l'invention pourrait donc être utilisé pour cribler des composés ou des molécules capables de lever l'inhibition de la différenciation des cellules souches neurales n'exprimant plus le gène Ptc.

Un procédé de criblage pourrait consister par exemple en la mise en contact d'un
15 composé, susceptible de lever l'inhibition de la différenciation induite par l'absence d'expression ou d'activité de Ptc, avec des cellules souches neurales de génotype $Glast-CreERT2 ; Ptc^{-/-}$.

Encore un autre aspect de l'invention concerne spécifiquement les cellules astrocytaires. L'invention concerne dans cet aspect une méthode d'étude de la
20 plasticité des astrocytes comprenant l'étude des cellules astrocytaires susceptibles d'être obtenues à partir des animaux transgéniques susmentionnés.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples et des figures détaillés ci-après.

Légende des figures :

Délétion inductible de Ptc dans les astrocytes et les cellules souches neurales de
25 **la zone subépendymaire de cerveau adulte.**

Cx : cortex cérébral, LV : ventricule latéral, Sp : aire septale.

Les figures 1A à 1C représentent des coupes d'immunohistofluorescence indiquant la présence d'une population de cellules Ptc^{+} co-exprimant le marqueur astroglial GFAP dans la partie dorsale de zone subépendymaire. Les élargissements des régions
30 encadrées sont présentés sous chaque figure. La barre représente 50 μm .

La figure 1A représente un double marquage GFAP et DAPI.

La figure 1B représente un double marquage Ptc et DAPI.

La figure 1 C représente un double marquage Ptc et GFAP.

Les figures 2A à 2C représentent une double immunohistofluorescence sur des lames
35 de cerveau de souris hétérozygotes $Ptc^{+}/LacZ$ exprimant le rapporteur sur un allèle Ptc utilisant des anticorps anti- β -galactosidase et anti-GLAST. Les élargissements des régions encadrées sont présentés sous chaque figure et montrent noyaux βGal^{+}

entourés d'un signal GLAST+ (têtes de flèches blanches) ou non (tête de flèche blanche et noire). La barre représente 50 μm .

La figure 2A représente un double marquage GLAST et DAPI.

La figure 2B représente un double marquage β -Gal et DAPI.

- 5 La figure 2C représente la superposition des marquages des figures 2A et 2B.

Les figures 3A à 3F représentent les signaux fluorescents YFP, GLAST et GFAP de la zone subépendymaire de souris *Glast-CreERT2;R26R-YFP* (YFP témoin) deux mois après l'administration de tamoxifène. La flèche blanche indique une cellule co-exprimant YP avec soit le marqueur *Glast*, soit le marqueur GFAP. Les carrés
10 correspondent à des agrandissements de la région indiquée par la flèche. Les noyaux sont marqués au DAPI. La barre représente 100 μm .

La figure 3A représente un double marquage YFP et DAPI.

La figure 3B représente un double marquage *Glast* et DAPI.

La figure 3C représente la superposition des marquages des figures 3A et 3B.

- 15 La figure 3D représente un double marquage YFP et DAPI.

La figure 3E représente un double marquage GFAP et DAPI.

La figure 3F représente la superposition des marquages des figures 3D et 3E.

Les figures 4A à 4E représentent des hybridations in situ de deux gènes cibles de *hedgehog* : *Ptc* et *Gli1*. Dans les souris *Ptc^{-/-}* (*Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*), les exons 8 et 9
20 sont flanqués de sites loxP. Dans ces souris, les exons 8 et 9 sont délétés par l'activation au tamoxifène de la recombinaise CreERT2 sous contrôle du promoteur *Glast* (*Glast-CreERT2*) qui est exprimée à partir du locus endogène *Glast*. Les souris *Ptc^{fl/fl}* traitées au tamoxifène sont utilisées en contrôle. Les animaux sont étudiés deux mois après le traitement au tamoxifène. Une sonde ribonucléique *Ptc del* couvrant les
25 exons 8 et 9 du gène *Ptc* est utilisée pour détecter les transcrits sauvages *Ptc*. Cette sonde correspond à la moitié de la longueur totale du transcrit *Ptc* et comprend la partie C-terminale. Dans les souris témoins, la sonde *Ptc del*, *Ptc* et *Gli* permettent la détection d'un faible marquage précédemment décrit dans la zone subépendymaire avec un marquage plus intense dans la niche ventrale. Dans les souris *Ptc^{-/-}*, de forts
30 signaux *Ptc* et *Gli* sont détectés dans les régions ventrales et dorsales de la zone subépendymaire, tandis qu'aucun signal n'est observé avec la sonde ribonucléique *Ptc del*. Les régions encadrées correspondent à un agrandissement de la région indiquée par un carré noir. La barre représente 200 μm .

La figure 4A représente le marquage avec la sonde *Ptc del* sur les souris témoins.

- 35 La figure 4B représente le marquage avec la sonde *Ptc del* sur les souris *Ptc^{-/-}*.

La figure 4C représente le marquage *Ptc* sur les souris témoins.

La figure 4D représente le marquage *Ptc* sur les souris *Ptc^{-/-}*.

La figure 4E représente le marquage Gli1 sur les souris témoins.

La figure 4F représente le marquage Gli1 sur les souris $Ptc^{-/-}$.

Altération de la prolifération cellulaire et phénotype chez l'adulte SEZ/RMS après délétion de Ptc.

- 5 **Les figures 5A et 5B** représentent la détection par immunohistofluorescence de la prolifération des cellules en utilisant un anticorps anti BrdU sur des lames de cerveau de souris $Ptc^{-/-}$ et témoins, traitées un an auparavant avec du tamoxifène et analysées deux heures après une courte pulsation de BrdU. La barre représente 10 μ m.

La figure 5A représente un double marquage BrdU et DAPI sur des souris témoins.

- 10 La figure 5B représente un double marquage BrdU et DAPI sur des souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 6 représente un histogramme montrant l'évolution du nombre de cellules BrdU+ et GFAP+ dans la zone subépendymaire après traitement au tamoxifène. L'axe des ordonnées représente le nombre de cellules BrdU+ par mm^2 , et l'axe des abscisses représente le temps après le traitement : 10 jours, 2 mois, 6 mois et 1 an. $**p \leq 0.001$.

- 15 **Les figures 7A à 7F** représentent des photos d'immunohistofluorescence indiquant l'expression du récepteur à l'EFR (EGFR) et de PSA-NCAM dans la zone subépendymaire des souris témoin et $Ptc^{-/-}$ un an après l'administration de tamoxifène. CPU, caudate putamen; LV, ventricule latéral. La barre représente 50 μ m.

La figure 7A représente le marquage EGFR sur les souris témoins.

- 20 La figure 7B représente le marquage EGFR sur les souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 7C représente le marquage PSA-NCAM sur les souris témoins.

La figure 7D représente le marquage PSA-NCAM sur les souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 7E représente le triple marquage EGFR, PSA-NCAM et DAPI sur les souris témoins.

- 25 La figure 7F représente le triple marquage EGFR, PSA-NCAM et DAPI sur les souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 8 représente un graphique illustrant et quantifiant les résultats décrits dans les figures 7A à 7F. L'axe des ordonnées représente le nombre de cellules positives par mm^2 . $**p \leq 0.001$.

- 30 **Les figures 9A et 9B** représentent des immunohistofluorescences montrant l'expression du gène GFAP dans la région subépendymaire s chez des souris témoins et $Ptc^{-/-}$ un an après le traitement au tamoxifène. La barre représente 50 μ m.

La figure 9A représente le marquage GFAP sur des souris témoins.

La figure 9B représente le marquage GFAP sur des souris $Ptc^{-/-}$.

- 35 **La figure 10** représente un graphique illustrant et quantifiant les résultats décrits dans les figures 9A et 9B. L'axe des ordonnées représente le nombre de cellules GFAP par mm^2 , et l'axe des ordonnées représente le temps après le traitement au tamoxifène (10

jours, 2 mois et 1 an).

Les figures 11A à 11L sont des micrographies fluorescentes de la région subépendymaire de souris adultes témoins ou $Ptc^{-/-}$. Ces micrographies montrent les immunomarquages pour Glaxt et GFAP/Ki67 en tant que marqueurs astrocytaires et des cellules souches, Sox2 et Sox9 en tant que facteurs de transcriptions nécessaires à la formation des cellules souches neurales, EGFR et PSA-NCAM en tant que marqueur de TAP et de migration des neuroblastes. En parallèle, les marquages au BrdU indiquent la prolifération cellulaire. Les lignes discontinues délimitent la barrière entre le ventricule latéral, ou le corpus callosum, selon l'indication. cc, corpus callosum; CPu, caudate putamen; LV, ventricule latéral. La barre représente 100 μ m sauf pour le double marquage GFAP/Ki67 où elle représente 25 μ m.

La figure 11A représente le double marquage DAPI et Glaxt sur les souris témoins.

La figure 11B représente le double marquage DAPI et Glaxt sur les souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 11C représente le double marquage GFAP et Ki67 sur les souris témoins.

La figure 11D représente le double marquage GFAP et Ki67 sur les souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 11E représente le double marquage Sox2 et DAPI sur les souris témoins.

La figure 11F représente le double marquage Sox2 et DAPI sur les souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 11G représente le double marquage Sox9 et DAPI sur les souris témoins.

La figure 11H représente le double marquage Sox9 et DAPI sur les souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 11I représente le double marquage EGFR et DAPI sur les souris témoins.

La figure 11J représente le double marquage EGFR et DAPI sur les souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 11K représente le double marquage BrdU et PSA-NCAM sur les souris témoins.

La figure 11L représente le double marquage BrdU et PSA-NCAM sur les souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 12 représente un histogramme montrant le nombre de chaque type cellulaire par mm^2 identifiées aux figures 11A à L. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ l'écart type pour 2 à 4 lames par animal pour 3 à 4 animaux. $*p \leq 0.05$.

Destinée cellulaire après délétion de Ptc dans la zone subépendymaire.

Les figures 13A à 13H sont des photos de fluorescence des cellules Glaxt+ dans des souris YFP- $Ptc^{-/-}$ ou YFP-témoins traitées deux mois auparavant avec du tamoxifène. La YFP est détectée dans la zone subépendymaire, le courant de migration rostrale (RMS) et le bulbe olfactif (OB). Une plus faible densité de cellules YFP+ est observée dans le RMS et l'OB des souris YFP- $Ptc^{-/-}$ comparé aux souris YFP-témoins. Par contre, aucune différence n'est observée dans la zone subépendymaire. La barre représente 50 μ m.

La figure 11A représente le double marquage DAPI et YFP sur les souris témoins, dans la zone subépendymaire.

La figure 11B représente le double marquage DAPI et YFP sur les souris témoins, dans

le courant de migration rostrale.

La figure 11C représente le double marquage DAPI et YFP sur les souris témoins, dans le bulbe olfactif granulaire (GrO).

La figure 11D représente le double marquage DAPI et YFP sur les souris témoins, dans
5 la couche glomérulaire (GI).

La figure 11E représente le double marquage DAPI et YFP sur les souris $Ptc^{-/-}$, dans la zone subépendymaire.

La figure 11F représente le double marquage DAPI et YFP sur les souris $Ptc^{-/-}$, dans le courant de migration rostrale.

10 La figure 11G représente le double marquage DAPI et YFP sur les souris $Ptc^{-/-}$, dans le GrO.

La figure 11H représente le double marquage DAPI et YFP sur les souris $Ptc^{-/-}$, dans la GI.

Les figures 14A à 14C représentent des histogrammes montrant la densité de cellules
15 YFP+ dans (14A) la région subépendymaire, (14B) Gro et (14C) GI. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ l'écart type de 2 à 4 lames par animal, pour 3 à 4 animaux. L'axe des abscisses représente le nombre de cellules YFP+ par mm^2 . Les colonnes grises représentent les animaux témoins, les colonnes noires représentent les souris $Ptc^{-/-}$.

Les figures 15A à 15J représentent des immunohistofluorescence utilisant les
20 marqueurs NeuN, c-fos, Cb, TH, ou des mybrydations in situ utilisant une sonde v-Glut2 sur des lames de souris YFP-témoins ou YFP- $Ptc^{-/-}$ au niveau du bulbe olfactif. Les têtes de flèches blanches montrent un double marquage. La barre représente 50 μm .

La figure 15A représente le double marquage YFP et NeuN sur des souris YFP-témoins.

25 La figure 15B représente le double marquage YFP et c-fos sur des souris YFP-témoins.

La figure 15C représente le double marquage YFP et Cb sur des souris YFP-témoins.

La figure 15D représente le double marquage YFP et TH sur des souris YFP-témoins.

La figure 15E représente le double marquage YFP et v-Glut2 sur des souris YFP-témoins.

30 La figure 15F représente le double marquage YFP et NeuN sur des souris YFP- $Ptc^{-/-}$.

La figure 15G représente le double marquage YFP et c-fos sur des souris YFP- $Ptc^{-/-}$.

La figure 15H représente le double marquage YFP et Cb sur des souris YFP- $Ptc^{-/-}$.

La figure 15I représente le double marquage YFP et TH sur des souris YFP- $Ptc^{-/-}$.

La figure 15J représente le double marquage YFP et v-Glut2 sur des souris YFP- $Ptc^{-/-}$.

35 **La figure 16** est un histogramme montrant le pourcentage de chacune des cellules dans la population YFP. *** $p \leq 0.0005$.

Les figures 17A et 17B représentent des lames de cerveaux de réalisées au niveau de

OB dans des souris témoins (17A) et $Ptc^{-/-}$ (17B) traitées un an auparavant avec du tamoxifène, les lames sont colorées à l'éosine et à l'hémaroxyline. Aucune altération de l'architecture cellulaire multicouche n'est observée dans l'OB. La barre représente 200 μm .

5 **L'activation soutenue de la voie Hh dans des progéniteurs neuraux dérivés de la région subépendymaire maintient la multipotence des cellules souches neurales dans des tests de formations de neurosphères.**

Les figures 18A à 18B représentent respectivement des tests de formation de neurosphères à partir de cellules issues de souris témoins et de souris $Ptc^{-/-}$. Les neurosphères de cellules issues de la zone subépendymaire sont analysées deux mois après l'administration de tamoxifène.

La barre représente 100 μm

La figure 18C montre l'expression du gène *Gli1* à partir des neurosphères décrites aux figures 18A et 18B. On observe une hausse de l'expression de *Gli1* dans les cellules $Ptc^{-/-}$ par rapport aux cellules témoins.

La figure 19 représente le nombre de neurosphères obtenues à chaque passage a été analysé par un modèle de régression linéaire. Le taux d'expansion clonale est représenté par la pente des courbes ($Ptc^{-/-}$ 0.256 ± 0.047 vs témoin 0.226 ± 0.016 , $p > 0.05$).

La figure 20 est un graphique représentant le pourcentage du nombre total de de sphères obtenues à partir de 5000 cellulesensemencées (138 pour les souris $Ptc^{-/-}$ et 98 pour les souris témoins). Les barres représentent : en blanc le nombre de sphères de diamètre supérieur à 100 μm , en gris clair le nombre de sphères de diamètre compris entre 50 et 100 μm , et en gris foncé le nombre de sphère de diamètre compris entre 5 et 50 μm .

La figure 21 est un graphique représentant l'évaluation de l'expression de marqueurs de cellules progénitrices (*Sox2*, *Sox9* et *Nestine*) dans les cellules issues de neurosphères dissociées 12h après ensemencement en présence de facteurs de croissances. La quantification de chaque type cellulaire indique une augmentation du nombre de cellules *Sox9+* et *Nestine+*. Les nombres moyens de cellules comptées sont 227 ± 67 pour les cellules $Ptc^{-/-}$ et 356 ± 147 pour les cellules témoins. *, $p \leq 0.05$, **, $p \leq 0.01$.

Les figures 22 à 24 représentent des histogrammes montrant le potentiel de différenciation de neurosphères issues de souris $Ptc^{-/-}$ et témoins cultivées 7 jours sans facteurs de croissance en présence ou non d'un modulateur pharmacologique de Hh, incluant un agoniste de Smo (SAG ; 0,3 μM) et un antagoniste de Smo (MRT-83 ; 3 μM). Les cellules différenciées sont analysées par immunohistofluorescence en utilisant

des anticorps anti-Tuj1, anti-GFAP et anti Oli2 pour caractériser les cellules neuronales (Figure 22), les cellules astrogliales (figure 23) et oligodendrogliales (figure 24). En absence de drogue, une diminution significative des du pourcentage de cellules Tj1+ et Olig2+ est observée dans les cellules *Ptc*^{-/-} comparées aux cellules témoins. Le nombre moyen de cellules pour chaque marqueur est 1699±309 pour les cellules *Ptc*^{-/-} et 3822±128 pour les cellules témoins. Les données sont des moyennes ± l'écart type du pourcentage de noyaux DAPI+ qui expriment les marqueurs. ***, p≤0.005; ns, non significatif. Les barres noires représentent les cellules *Ptc*^{-/-}, les barres grises représentent les cellules témoins.

10 **Le déficit en *Ptc* augmente la division symétrique des cellules souches neurales en régulant positivement la voie de signalisation Notch.**

Les figures 25A à 25H représentent des tests de mesurant la symétrie des divisions cellulaires réalisés à partir de cellules isolées de la zone subépendymaire de souris sauvages. Les cellules sont cultivées pendant 24 à 36 heures en présence des drogues indiquées. Les cellules ont marquées avec Glast et EGFR en tant que marqueurs de
15 cellules souches neurales et de progéniteurs transitoires en expansion. Les noyaux sont marqués au DAPI.

La figure 25A représente un double marquage Glast et DAPI.

La figure 25B représente un double marquage EGFR et DAPI.

20 La figure 25C représente un double marquage Glast et DAPI, après traitement au SAG (0,3 µM).

La figure 25D représente un double marquage EGFR et DAPI, après traitement au SAG (0,3 µM).

25 La figure 25E représente un double marquage Glast et DAPI, après traitement au LY411575 (10 µM).

La figure 25F représente un double marquage EGFR et DAPI, après traitement au LY411575 (10 µM).

La figure 25G représente un double marquage Glast et DAPI, après traitement au LY411575 (10 µM) et au SAG (0,3 µM).

30 La figure 25H représente un double marquage EGFR et DAPI, après traitement au LY411575 (10 µM) SAG (0,3 µM).

La figure 26 est un histogramme montrant l'analyse quantitative du pourcentage de chaque type de division. Ces données montrent que le traitement au SAG augmente le nombre de paires symétriques Glast+/EGFR- comparé aux conditions basales sans
35 drogue. Cet effet est contrecarré par un traitement simultané avec un antagoniste de Smo et Notch, respectivement MRT-83 et LY411575.

La figure 27 montre une augmentation de l'expression de Gli1 (D), Notch1 (A), et les

effecteurs de Notch Hes1 (B) et Hes5 (C) dans les progéniteurs isolés dérivés de la zone subépendymaire de souris adultes $Ptc^{-/-}$ par rapport aux animaux contrôles. Les résultats sont présentés sous forme de gel présentant les résultats de PCR semi-quantitative. L'actine- β est utilisée comme contrôle de charge des ARN.

- 5 **Les figures 28A à 28F** représentent un test de mesure de la symétrie des divisions cellulaires à partir de précurseurs isolés dérivés de la zone subépendymaire de souris adultes $Ptc^{-/-}$ et témoins, indiquant que les cellules exprimant Glast issues des souris $Ptc^{-/-}$ génèrent fréquemment deux précurseur Glast+ après 24 à 36h, comparé aux cultures témoins.
- 10 La figure 28A représente une division symétrique de cellule EGFR-, marquée avec Glast et du DAPI.
La figure 28B représente une division symétrique de cellule EGFR-, marquée avec EGFR et du DAPI.
La figure 28C représente une division symétrique de cellule EGFR+, marquée avec Glast et du DAPI.
- 15 La figure 28D représente une division symétrique de cellule EGFR+, marquée avec EGFR et du DAPI.
La figure 28E représente une division asymétrique d'une cellule marquée avec Glast et du DAPI.
- 20 La figure 28F représente une division asymétrique d'une cellule marquée avec EGFR et du DAPI.
- La figure 29** est un histogramme représentant les données quantifiées des expériences présentées aux figures 28A et 28B.
- Les figures 30A à 30D** représentent des marquages fluorescents BrdU et Ki67 de lames de zone subépendymaire dérivées de souris $Ptc^{-/-}$ et témoins qui ont été traitées avec du tamoxifène 2 mois auparavant et qui ont été analysées 2h ou 24h après une simple injection de BrdU. Les têtes de flèches montrent les cellules the BrdU+Ki67-. La barre représente 100 μ m.
- 25 La figure 30 A montre un double marquage BrdU/Ki67 réalisé 2h après injection du BrdU sur des cellules issues de souris témoins.
- 30 La figure 30 B montre un double marquage BrdU/Ki67 réalisé 24h après injection du BrdU sur des cellules issues de souris témoins.
- La figure 30 C montre un double marquage BrdU/Ki67 réalisé 2h après injection du BrdU sur des cellules issues de souris $Ptc^{-/-}$.
- 35 La figure 30 D montre un double marquage BrdU/Ki67 réalisé 24h après injection du BrdU sur des cellules issues de souris $Ptc^{-/-}$.
- La figure 31** montre le pourcentage de cellules BrdU+ cells dans la population de

cellules en division 2h après l'injection de BrdU. Les valeurs sont des moyennes $\pm$ l'écart type de trois expériences.

La figure 32 montre le pourcentage de cellules BrdU+ cells dans la population de cellules en division 24h après l'injection de BrdU. Les valeurs sont des moyennes $\pm$

5 l'écart type de trois expériences. **, $p \leq 0.01$

Reconstitution de la niche de cellules souches de la zone subépendymaire dans des souris $Ptc^{-/-}$ après injection d'AraC *in vivo*.

Les figures 33A à 33C correspondent à des vues coronaires de la zone subépendymaire montrant les cellules ayant incorporé le BrdU 10j après le retrait de la pompe dans des animaux $Ptc^{-/-}$ ou témoins traités avec un placebo ou de l'AraC. Les animaux ont reçu du tamoxifène six mois avant l'expérience. La barre représente 100 μm

La figure 33A représente le marquage BrdU/DAPI de souris témoins traitées avec le placebo.

15 La figure 33B représente le marquage BrdU/DAPI de souris témoins traitées avec l'AraC.

La figure 33C représente le marquage BrdU/DAPI de souris $Ptc^{-/-}$ traitées avec le placebo.

La figure 33D représente le marquage BrdU/DAPI de souris $Ptc^{-/-}$ traitées avec l'AraC.

20 **La figure 34** est un histogramme montrant la quantification des cellules marquées au BrdU chez les animaux témoins et chez les animaux $Ptc^{-/-}$. ***, $p \leq 0.0001$; ns, non significatif.

Expression de Ptc dans la zone subépendymaire adulte.

La figure 35 est une hybridation in situ du transcrit Ptc dans la partie dorsale de la zone subépendymaire. La photo du bas est un agrandissement de la région encadrée de la photo du haut. La barre représente 100 μm .

Les figures 36A à 36C sont des marquages immunohistofluorescents réalisés au niveau de la partie dorsale de la zone subépendymaire en utilisant un sérum anti Ptc . Les signaux associés aux cellules Ptc^{+} sont observés dans la zone subépendymaire.

30 La figure 36A représente le marquage avec l'anti sérum. La barre représente 25 μm .

La figure 36B représente le marquage avec le DAPI.

La figure 36C représente la superposition des marquages.

Les figures 37A à 37C sont des marquages immunohistofluorescents réalisés au niveau de la partie dorsale de la zone subépendymaire en utilisant un sérum anti Ptc prétraité avec une protéine de fusion utilisée pour l'immunisation. Les signaux associés aux cellules Ptc^{+} ne sont pas observés dans la zone subépendymaire. La barre représente 25 μm .

La figure 37A représente le marquage avec l'anti sérum, pré traité.

La figure 37B représente le marquage avec le DAPI.

La figure 37C représente la superposition des marquages.

Les figures 38 et 39 représentent des marquages immunohistofluorescents réalisés au
5 niveau de la zone subépendymaire en utilisant le sérum anti-Ptc (Figure 38) ou le
sérum pré-immun (figure 39). Le sérum permet d'identifier les cellules Ptc+ tandis que
le sérum pré-immun ne le permet pas.

La figure 40 représente un western-blot analysant des lysats totaux (4µg de protéines)
de cellules HEK293 transfectées transitoirement avec un vecteur vide (mock) ou avec
10 un vecteur contenant la séquence complète du Ptc murin. Les protéines ont été
séparées par SDS-PAGE et révélées en utilisant un sérum anti-Ptc. La tête de flèche
indique une bande majoritaire de 140 kDa détectées dans les cellules HEK293-Ptc mais
pas dans les cellules HEK293-mock. Un second signal de 200 kDa est détecté dans les
cellules HEK293-Ptc pouvant témoigner de modifications post traductionnelles. Des
15 protéines de cerveau (Cb, 30µg) ont été analysées avec le sérum anti Ptc et on observe
une bande de 140 kDa. Ce signal disparaît dans le cerveau (Cb*) lorsque le sérum est
prétraité avec la fusion ayant permis l'immunisation. La charge est contrôlée par la
détection de l'actine.

Caractérisation de la recombinaison Cre-dans des souris transgéniques.

20 **Les figures 41A à 41G** représentent des images de fluorescence obtenue à partir
d'animaux YFP-témoins ayant reçus une dose de tamoxifène pendant 5 jours, et
analysés 2 mois après l'induction.

La figure 41A représente un cerveau complet. Le marquage représente l'expression de
la YFP. La barre représente 500µm. Cb, cerveau; cc, corpus callosum; CPu, caudate
25 putamen; Cx, cortex cérébral; DG, dentate gyrus; LV, ventricule latéral; OB, bulbe
olfactif; RMS, courant de migration rostrale.

La figure 41B est un agrandissement de la région du bulbe olfactif.

La figure 41C est un agrandissement de la région du caudate putamen.

La figure 41D est un agrandissement de la région de la zone subépendymaire .

30 La figure 41E est un agrandissement de la région du cortex cérébral.

La figure 41F est un agrandissement de la région du dentate gyrus.

La figure 41G est un agrandissement de la région du cerveau.

Les figures 42A à 42D représentent des hybridations in situ utilisant une sonde
ribonucléique de Gli1 sur des lames issues de souris Glast-CreERT2/Ptc^{fl/fl} traitées
35 avec un placebo ou du tamoxifène 10 jours avant l'analyse. L'induction de Gli1 est
détectée seulement après traitement au tamoxifène.

La figure 42A représente un marquage sur des souris Glast-CreERT2/Ptc^{fl/fl} traitées

avec le placebo. La barre représente 400 μm .

La figure 42B représente un marquage sur des souris $\text{Glast-CreERT2/Ptc}^{\text{fl/fl}}$ traitées avec le tamoxifène. La barre représente 400 μm .

La figure 42C représente un agrandissement de la région marquée par un carré sur la figure 42A. La barre représente 100 μm .

La figure 42D représente un agrandissement de la région marquée par un carré sur la figure 42B. La barre représente 100 μm .

Les figures 43A et 43B montrent que l'expression de Gli1 est fortement augmentée sur les lames issues de souris $\text{Ptc}^{-/-}$ un an après le traitement au tamoxifène. La barre représente 200 μm .

La figure 43A est une hybridation in situ utilisant la sonde ribonucléique Gli1 sur des lames issues de souris témoins.

La figure 43B est une hybridation in situ utilisant la sonde ribonucléique Gli1 sur des lames issues de souris $\text{Ptc}^{-/-}$.

La délétion conditionnelle de Ptc dans les cellules Glast+ de la zone subépendymaire ne modifie pas l'apoptose cellulaire.

Les figures 44A et 44B sont des expériences de mesure d'apoptose par TUNEL sur des zones subépendymaires de souris témoins (Figure 44B) ou de souris $\text{Ptc}^{-/-}$ (figure 44A). La barre représente 100 μm .

La figure 45 est un histogramme montrant la quantification des noyaux apoptotiques de cellules de la zone subépendymaire de souris témoins ou $\text{Ptc}^{-/-}$ 10 jours ou 1 an après traitement au tamoxifène.

Recombinaison dans le lignage oligodendroglial.

Les figures 46A et 46B représentent des immunohistofluorescences détectant Olig2 réalisées au niveau du corpus callosum de souris YFP-témoins et YFP- $\text{Ptc}^{-/-}$. Les cellules exprimant la YFP correspondent à la fois aux astrocytes endogènes exprimant Glast et aux progénitures des cellules souches Glast+ née dans la zone subépendymaire et qui ont migré et se sont différenciées en cellules du lignage oligodendroglial. La barre représente

La figure 4A représente un double marquage YFP Olig2 dans des souris YFP-témoins. La figure 4A représente un double marquage YFP Olig2 dans des souris YFP- $\text{Ptc}^{-/-}$.

Les figures 47 et 48 représentent des histogrammes montrant la quantification de la densité de cellules YFP+ (figure 47 ; nombre de cellules YFP+ par mm^2) et le pourcentage de cellules YFP+ (figure 48) qui coexpriment Olig2 dans des souris YFP-control et YFP- $\text{Ptc}^{-/-}$. Le nombre de cellules comptées : 187 pour YFP-témoins et 74 pour YFP- $\text{Ptc}^{-/-}$).

Visualisation de cultures cellulaires dérivées de la zone subépendymaire de

souris témoins et de souris $Ptc^{-/-}$

Les figures 49A à 49F représentent des immunohistofluorescences utilisant des anticorps anti- Sox2, anti-Sox9 et anti-Nestine réalisées sur des cultures de précurseurs maintenus en absence de facteurs de croissance pendant 12h avant l'expérience. Les noyaux sont marqués au DAPI. La barre représente 100 μ m.

La figure 49A représente un double marquage Sox2/DAPI sur des cultures issues de souris témoins.

La figure 49B représente un double marquage Sox2/DAPI sur des cultures issues de souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 49C représente un double marquage Sox9/DAPI sur des cultures issues de souris témoins.

La figure 49B représente un double marquage Sox9/DAPI sur des cultures issues de souris $Ptc^{-/-}$.

La figure 49D représente un double marquage Nestine/DAPI sur des cultures issues de souris témoins.

La figure 49E représente un double marquage Nestine/DAPI sur des cultures issues de souris $Ptc^{-/-}$.

Les figures 50A à 50R représentent des immunohistofluorescences utilisant des anticorps anti-Tuj1, anti-Olig2 et anti-GFAP réalisé sur des cellules précurseurs issues de souris témoins ou $Ptc^{-/-}$ maintenues 7 jours avant l'expérience en présence ou en l'absence de l'agoniste de Hh SAG (0,3 μ M) et l'antagoniste de Hh MRT-83 (3 μ M). Les noyaux sont marqués au DAPI. La barre représente 100 μ m.

La figure 50A représente un double marquage Tuj1/DAPI sur des cellules témoins, sans traitement.

La figure 50B représente un double marquage Tuj1/DAPI sur des cellules témoins, traitées avec du SAG.

La figure 50C représente un double marquage Tuj1/DAPI sur des cellules témoins, traitées avec du MRT-83.

La figure 50D représente un double marquage Tuj1/DAPI sur des cellules $Ptc^{-/-}$ sans traitement.

La figure 50E représente un double marquage Tuj1/DAPI sur des cellules $Ptc^{-/-}$ traitées avec du SAG.

La figure 50F représente un double marquage Tuj1/DAPI sur des cellules $Ptc^{-/-}$ traitées avec du MRT-83.

La figure 50G représente un double marquage Olig2/DAPI sur des cellules témoins, sans traitement.

La figure 50H représente un double marquage Olig2/DAPI sur des cellules témoins,

traitées avec du SAG.

La figure 50I représente un double marquage Olig2/DAPI sur des cellules témoins, traitées avec du MRT-83.

La figure 50J représente un double marquage Olig2/DAPI sur des cellules $Ptc^{-/-}$ sans traitement.

La figure 50K représente un double marquage Olig2/DAPI sur des cellules $Ptc^{-/-}$ traitées avec du SAG.

La figure 50L représente un double marquage Olig2/DAPI sur des cellules $Ptc^{-/-}$ traitées avec du MRT-83.

La figure 50M représente un double marquage GFAP/DAPI sur des cellules témoins, sans traitement.

La figure 50N représente un double marquage GFAP/DAPI sur des cellules témoins, traitées avec du SAG.

La figure 50O représente un double marquage GFAP/DAPI sur des cellules témoins, traitées avec du MRT-83.

La figure 50P représente un double marquage GFAP/DAPI sur des cellules $Ptc^{-/-}$ sans traitement.

La figure 50Q représente un double marquage GFAP/DAPI sur des cellules $Ptc^{-/-}$ traitées avec du SAG.

La figure 50R représente un double marquage GFAP/DAPI sur des cellules $Ptc^{-/-}$ traitées avec du MRT-83.

Déplétion des cellules incorporant du BrdU dans la région subépendymaire s de souris sauvages.

Les figures 51A à 51C sont des vues coronales de région subépendymaire s montrant des cellules incorporant du BrdU après injection d'AraC ou de placebo dans des souris sauvages.

La figure 51A représente un simple marquage BrdU sur des souris traitées avec le placebo.

La figure 51B représente un simple marquage BrdU sur des souris traitées avec l'AraC.

La figure 51C représente un double marquage BrdU/DAPI sur des souris traitées avec le placebo.

La figure 51D représente un double marquage BrdU/DAPI sur des souris traitées avec l'AraC.

La figure 52 représente un histogramme quantifiant le nombre de cellules BrdU+/mm², dénotant d'une diminution de la prolifération dans les souris traitées à l'AraC. ***, $p \leq 0.0001$.

Influence de la délétion de Ptc sur la masse des souris

La figure 53 représente un histogramme montrant la réduction de masse des souris YFP-Ptc^{-/-} par rapport aux souris YFP-témoins après l'injection pendant une semaine de tamoxifène à des souris âgées de 2 à 4 mois. La masse est mesurée 5 mois après injection, et on observe une diminution de 25% de la masse des souris Ptc^{-/-}. Test T de

5 Student *** p<0.0001.

EXEMPLE

Les cellules souches neurales (NSC) sont confinées dans des niches spécialisées du cerveau tout au long de la vie et donnent des nouveaux neurones qui intègrent les circuits neuronaux. Il est proposé qu'elles participent à la réparation des tissus endommagés. La zone subépendymaire (SEZ), une des principales niches dans le

10 cerveau mammifère adulte, est constitué de NSC de type astrocytes correspondant à une population hétérogène de cellules. Parmi les sous populations identifiées, les NSC actives (aNSC) exprimant le récepteur aux facteurs de croissance épidermique (EGFR) donne lieu à des progéniteurs transitoires à amplification rapide (TAP). La plupart de

15 ces cellules génèrent des neuroblastes migrants le long de la tige ventrale.

Les cellules souches neurales quiescentes n'expriment pas le récepteur à l'EGF (EGFR) et sont résistantes aux drogues anti mitotique ou un l'irradiation. Elle participe au renouvellement de la neurogenèse de la zone subépendymaire via des cellules souches neurales actives et les TAP.

20 La voie Sonic Hedgehog (Shh) est active dans la zone subépendymaire adulte où il a été proposé son rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire, et module la migration des neuroblastes. L'inactivation du récepteur Smoothened (Smo) dans les cellules exprimant le marqueur neuroépithéliales Nestine suggère l'implication de ce transducteur du signal Shh pour le maintien de la population de cellules souches

25 neurales. Patched (Ptc) est le principal récepteur de Shh et est considéré comme un antagoniste de cette voie de signalisation. La délétion embryonnaire de Ptc dans les cellules souches multipotentes (hGFAP)-Cre;Ptc^{C/C} conduit à l'apparition médulloblastomes chez la souris. Les tumeurs ne se manifestent que lorsque les cellules se sont engagées dans le lignage neural. Toutefois les effets de l'inactivation de

30 Ptc dans les cellules souches neurales adultes de la zone subépendymaire reste inconnus.

Les inventeurs ont utilisé un transgène Cre inducible au tamoxifène sous contrôle d'un promoteur spécifique des astrocytes exprimé dans les cellules souches neurales.

Les résultats montrent que l'inactivation de Ptc cellules souches neurales adultes de la

35 zone subépendymaire conduit à une diminution drastique processus de neurogenèse et une expansion notable des cellules souches dans la zone subépendymaire. Le blocage de la neurogenèse et du à une modification de la division cellulaire, qui passe

d'un mode asymétrique à un mode symétrique, conduisant à une diminution processus de différenciation impliquant la voie Notch.

La délétion conditionnelle de Ptc dans des cellules exprimant Glast induit une activation endogène du signal Hh dans la zone subépendymaire.

5 Pour étudier le rôle de Ptc dans les cellules souches neurales de la zone subépendymaire adulte, les inventeurs ont utilisé une approche génétique basée sur la délétion conditionnelle du récepteur dans la population astrogliale dans laquelle ils avaient formellement démontré cette expression (**Figures 1 à 4 et 35 à 40**). Les transcrits Ptc et les protéines Ptc ont été identifiés dans la SEZ. Une analyse par
10 microscopie confocale utilisant un sérum dirigé contre Ptc (**Figures 35 à 40**) montre que l'expression de Ptc est retrouvée dans les cellules GFAP $36 \pm 5\%$) (**Figures 1A à 1C**). De plus, l'analyse de souris $Ptc^{+/LacZ}$ permet de visualiser les cellules $\beta gal^{+}/Ptc^{+}$. Tycho exprime Glast, un marqueur des cellules souches neurales de type astrocytes. Par conséquent, les inventeurs ont tiré avantage des souris *Glast-CreERT2* exprimant
15 une Cre inductive au tamoxifène inséré en locus Glast pour induire une activité recombinase Cre dans les astrocytes adultes et les cellules souches neurales. Les souris *Glast-CreERT2* ont été croisées avec une lignée reporteur *ROSA2, R26R-YF*. Dans la descendance *Glast-CreERT2;Ptc^{wt/wt};R26R-YFP*, l'expression de la YFP est initiée après activation de la Cre recombinant par le tamoxifène et marque toutes les
20 cellules filles des cellules recombinées. Deux mois après le traitement, un grand nombre de cellules est détecté dans la SEZ et coexpriment les marqueurs Glast et GFAT (**Figures 3A à 3F**). L'analyse confocale de la niche SEZ montre que le rapporteur YFP est exprimé dans $85 \pm 5\%$ des cellules positives pour Glast. La recombinaison a également lieu dans les cellules astrogliales de la zone subgranulaire de l'hypocampe
25 et dans d'autres populations astrogliales à travers le cerveau, comme cela est attendu pour le gène Glast.

Ptc est inactivé dans les cellules positive pour Glast par croisement de souris *Gast-CreERT2* ou YFP-témoin avec des lignées de souris $Ptc^{fl/fl}$ permettant l'excision des exons 8 et 9 codant le domaine impliqué dans la liaison à Shh. Les souris adultes
30 *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}* (dites $Ptc^{-/-}$) et leur contrepartie $Ptc^{fl/fl}$ (appelées témoins) sont traitées avec du tamoxifène et étudiées 10 jours, 2, 6 ou 12 mois après. Malgré la perte de masse des animaux $Ptc^{-/-}$ traités avec le tamoxifène (**Figure 53**) un an avant, le cerveau de ces animaux est macroscopiquement similaire à celui des souris témoins. Aucune tumeur n'est détectable. L'étude de l'expression de Gli1 ou de Ptc est mesurée
35 comme contrôle de l'activation de la voie Hh. Dans les souris $Ptc^{-/-}$, les deux gènes sont fortement régulés positivement dans la région dorsale et ventrale de la SEZ montrant ainsi une activation soutenue de la voie Hh par rapport aux témoins. Des expériences

témoins additionnelles montrent la spécificité de la transcription à la fois de Gli1 et Ptc dans les animaux *Ptc*^{-/-} (**Figures 4A à 4F**; mais également **Figures 42A à 42D et 43A et 43B**).

Ces résultats montrent que la recombinaison médiée par la recombinaise Cre permet une délétion efficace de Ptc dans les cellules positives pour Glaxt conduisant ainsi à une activation persistante de la voie Hh dans la niche SEZ adulte.

La délétion de Ptc affecte la prolifération et diminue la neurogenèse.

Pour déterminer l'effet de la délétion de Ptc dans les cellules Glaxt⁺ dans la SEZ, le taux de prolifération rapide des cellules (TAP et neuroblastes) est mesuré par administration de BrdU par impulsion à des intervalles de 2h. Les impulsions ont été réalisées à différents temps (10 jours, 2, 6, 12 mois). Dans les animaux témoins, le nombre de cellules BrdU positives diminue entre 2 et 6 mois après le traitement, ce qui révèle probablement un déclin régulier lié à l'âge. De manière intéressante, les cellules BrdU positives diminuent dans les cellules de la SEZ des souris *Ptc*^{-/-} comparées aux souris témoins tout au long de l'étude. A 10 jours, la diminution de 27% est déjà hautement significative et cette diminution va jusqu'à 54% à 2 mois. La diminution de la prolifération rapide est observée jusqu'à 6 mois après traitement et a quasiment disparue au bout d'un an dans les souris *Ptc*^{-/-}. Les inventeurs ont exclu de leur hypothèses la diminution de la survie cellulaire puisque le nombre de cellules TUNEL positives n'est pas significativement différent dans la SEZ des souris *Ptc*^{-/-}, tout au long de l'étude. De manière remarquable, la visualisation des cellules EGFR⁺ dans la SEZ, montre une diminution de plus de 93% dans les souris *Ptc*^{-/-}, au bout de 12 mois. Le nombre de cellules PSA-NCAM est également réduit de plus de 90% dans les souris *Ptc*^{-/-}, ce qui est corrélé avec le fort taux d'excision dans ces animaux ce qui a pour conséquence une quasi absence de neuroblastes migrant de la SEZ (**Figures 7A à 7F et 8**). Par contre, la densité de cellules GFAP⁺ qui correspond aux astrocytes et aux cellules souches neurales dans la SEZ montre une augmentation de 62% dans les souris *Ptc*^{-/-}, après 12 mois (**Figures 9A et 9B et 10**).

A 2 mois, la quantification des populations cellules de la SEZ montre que la délétion de Ptc augmente de presque 2 fois le nombre de cellules Glaxt⁺ qui correspondent aux cellules astrocytaires et aux cellules souches neurales, et de presque 2 fois le nombre de cellules souches Ki67⁺/GFAP⁺. Les TAP et les neuroblastes diminuent de deux fois comme l'indique les marquages par l'EGFR et PSA-NCAM (**Figures 11A à 11L et 12**). De plus, en l'absence de Ptc, les inventeurs ont observé une augmentation du nombre de cellules Sox2⁺ et Sox9⁺, tous deux exprimés dans les TAP et les cellules souches neurales.

Ces données montrent que la délétion de Ptc est associée à une augmentation du

nombre de cellules souches neurales de type astrocytes dans la SEZ et une diminution du nombre de TAP et de neuroblastes migrants.

Les cellules filles issues des cellules recombinées sont suivies grâce à l'expression de la YFP dans les souris *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl};R26R-YFP* (dites *YFP-Ptc^{-/-}*) et dans les
5 souris YFP-témoins traitées au tamoxifène, deux mois après le traitement. Comme attendu, de forts signaux YFP sont détectés dans le système SEZ-RMS-OB des souris témoins (**Figure 13A à 13H**) et également dans le corpus callosum (cc) où elles révèlent les populations nouvelles issues de la SEZ et les cellules astrogliales exprimant *Glast* dans les tractus fibreux (**Figure 46A et 46B**). Dans les animaux *YFP-*
10 *Ptc^{-/-}*, la quantification des cellules YFP+ dans les couches granuleuses (GrO) et gloméruleuses (Gl) du bulbe olfactif (OB) (**Figure 14A à 14C**) et dans le cc (**Figures 46A et 46B and 47**) montre une diminution respective de 69%, 36% et 51%. De plus, le signal fluorescent est drastiquement réduit dans le RMS (qui relie la SEZ au OB) (**Figures 13A à 13H**).

15 Comme les résultats montrent une diminution des nouvelles cellules dans la SEZ, les inventeurs ont étudié le phénotype des cellules dérivées de la SEZ dans leurs organes de destination : OB (**Figures 15A à 15J et 16**), et cc (**Figure 48**). Dans le GrO, la couche de l'OB où les cellules mûrent en interneurones gabaergiques, le pourcentage de cellules YFP+ exprimant le marqueur neural NeuN ou *cfos*, un facteur de
20 transcription rapidement régulé par l'activité neurale, reste inchangé dans les souris *Ptc^{-/-}*. Ces données indiquent qu'il n'y a pas de différence dans la proportion de neurones ayant intégré la couche GrO. The inventeurs ont alors étudié le pourcentage de cellules YFP+ exprimant la tyrosine hydroxylase (TH), la calbindine ou le transporteur 2 vésiculaire du glutamate (*vGlut2*), qui marquent un sous-groupe de cellules ayant
25 intégré la couche Gl. Dans les mutants conditionnels *Ptc*, le pourcentage de cellules nouvellement générées marquées à la calbindine n'est pas significativement modifié. Par contre, le pourcentage de cellules YFP+ coexprimant soit TH ou *vGlut2* est respectivement trois fois plus élevé ou réduit. De manière remarquable, un an après le traitement au tamoxifène, l'architecture cellulaire multicouche de l'OB n'est pas
30 modifiée dans les souris *Ptc^{-/-}* comparé au témoin (**Figure 17A et 17B**). Dans le cc, une diminution de deux fois des cellules YFP+ exprimant *Olig2* est observée dans les souris *Ptc^{-/-}* (**Figure 48**) suggérant que la délétion de *Ptc* diminue la capacité de genèse de nouveaux précurseurs d'oligodendrocytes. L'ensemble de ces résultats montre que la genèse de nouveaux précurseurs est largement diminuée dans la SEZ des mutant *Ptc*
35 conditionnels. Bien que ces précurseurs aient encore la capacité de se différencier en neurones et en oligodendrocytes respectivement dans l'OB ou le cc, ils ne présentent pas les caractéristiques de la différenciation.

L'invalidation de Ptc dans les progéniteurs neuraux dérivés de la SEZ modifie la capacité de différenciation cellulaire dans des tests de neurospère.

Pour évaluer les conséquences de l'invalidation de Ptc dans les progéniteurs SEZ, les inventeurs ont utilisé le test des neurosphères pour étudier les propriétés des cellules souches et des cellules progénitrices dans les deux modèles Ptc^{-/-} et témoin. Aucune différence de formation des sphères de cellules dérivées de la SEZ de souris Ptc^{-/-} n'est observée deux mois après le traitement au tamoxifène, malgré une augmentation de l'expression de Gli (**Figures 18A à 18C et 19**). L'expansion clonale montre que l'absence de Ptc n'altère pas l'apparente capacité d'auto-renouvellement des neurosphères. Toutefois la quantification des sous populations des neurosphères selon leur diamètre montre un grand nombre de neurosphères larges ($\geq 100 \mu\text{m}$) dérivées de la SEZ de souris Ptc^{-/-} (**Figure 20**). Cette observation suggère que les neurosphères issues de la SEZ de souris Ptc^{-/-} possèdent plus de cellules souches que celles issues de la SEZ de souris témoin, puisque cela avait déjà été proposé que les cellules souches neurales actives donnent naissance à des sphères de large taille alors que les progéniteurs donnent naissance à des sphères plus petites. Ces résultats sont cohérents avec la diminution de TH dans la SEZ des animaux Ptc^{-/-}.

Une fois dissociées, les neurosphères sont cultivées pendant 12h en l'absence de facteurs de croissance. De manière significative, plus de cellules expriment le marqueur Sox9 dans les neurosphères Ptc^{-/-} comparé aux neurosphères témoins. (**Figure 21; voir également Figures 49A à 49F**). Par contre, l'expression de Sox2 n'est pas modifiée de manière significative dans les deux types de neurosphères, alors que le nombre de cellules neuroépithéliales Nestine positives est augmenté de 1,6 fois dans les souris déficientes en Ptc, ce qui témoigne d'une diminution de la différenciation. Pour étudier la multipotence des cellules souches neurales Ptc^{-/-}, les neurosphères ont été cultivées pendant 7 jours en l'absence de facteurs de croissance pour permettre la différenciation en neurones en oligodendrocytes et en astrocytes. Bien que les cellules souches neurales Ptc^{-/-} conservent leur multipotence, leur capacité à se différencier est modifiée (**Figures 21, 22 et 23; voir également Figures 50A à 50R**). Le pourcentage de neuroblastes Tuj1⁺ et d'oligodendrocytes Olig2⁺ est réduit significativement dans les souris Ptc^{-/-} tandis que le nombre d'astrocytes GFAP⁺ n'est pas modifié par la délétion de Ptc. La modulation par l'intermédiaire de Smo a été étudiée. (**Figures 21, 22 et 23**). En accord avec l'activation de Smo dans le phénotype Ptc^{-/-}, le nombre de neuroblastes Tuj1⁺, d'oligodendrocytes Olig2⁺ et d'astrocytes GFAP⁺ est réduit dans les souris témoins après addition de SAG, un activateur de Smo. Par contre, l'inhibiteur de Smo MRT-83 ne modifie pas la genèse des cellules suggérant que la voie Hh est antagonisée par Ptc. Toutefois, le MRT-83 augmente la

capacité des cellules $Ptc^{-/-}$ à se différencier en neuroblastes, en oligodendrocytes et en astrocytes. Aussi, la restauration du phénotype $Ptc^{-/-}$ par le blocage de Smo est associée à l'inhibition constitutive que Ptc exerce sur Smo. De plus, l'invalidation de Ptc diminue le nombre total de cellules entrant en différenciation bien qu'elle n'inhibe pas la différenciation terminale des cellules déjà engagée dans le processus de différenciation.

L'absence de Ptc dans les progéniteurs neuraux conduit à la formation de paires symétriques Glast+/EGFR+ par l'intermédiaire de la voie Notch et réduit la sortie du cycle cellulaire des TAP.

L'inactivation de Ptc dans les cellules Glast+ de la SEz adulte conduisant à une augmentation des cellules souches neurales a conduit les inventeurs à évaluer la potentielle interconnexion entre les voies Hh et Notch qui a été impliquée dans la régulation du cycle cellulaire durant la corticogénèse et le maintien des cellules souches neurales. Dans un premier temps, les inventeurs ont utilisé le test de clonalité des paires de cellules adapté du protocole décrit dans (Dave et al. 2011, PloS one 6, e14680).

Les cellules primaires ont étéensemencées directement après leur isolement de la SEZ et maintenues en culture pendant 24 à 36h pour permettre la division cellulaire. Les anticorps anti-Glast et anti-EGFR ont été utilisés pour marquer respectivement les cellules souches et leur descendance. Les cellules isolées de la SEZ de souris contrôles ont été traitées avec l'agoniste de Smo (SAG) en présence ou en l'absence d'inhibiteur de la γ -sécrétase, le LY411575, qui inhibe l'activation des récepteurs Notch endogènes dépendants de la protéolyse. Le SAG promeut les paires symétriques Glast+/EGFR- au dépens des paires Glast+/EGFR+ comparées aux conditions basales. L'effet médié par le SAG est contrebalancé par le traitement au LY411575 comme par le traitement à l'antagoniste de Smo MART-83 (**Figures 25A à 25H et 26**). Ces résultats indiquent la genèse de paires symétriques Glast+/EGFR- est dépendante de la voie Hh, correspondant à un état activé des cellules souches neurales différent de celui des cellules Glast+/EGFR+ qui est dépendant de la voie Notch. Les inventeurs ont alors réalisés des analyses par RT-PCR dans les neurosphères dérivées de zone sous ventriculaire (SVZ) d'animaux $Ptc^{-/-}$ ou contrôles traités au tamoxifène pendant deux mois. Notch, Hes1 et Hes5 sont surexprimés lorsque Ptc est invalidé (**Figures 27A à 27E**), démontrant que la voie Notch est activée par la délétion de Ptc.

Les inventeurs ont ensuite testé si l'effet sur la symétrie des cellules souches neurales Glast+/EGFR- observée sous activation pharmacologique de Smo pourrait être observé dans le cadre de la délétion de Ptc dans les cellules souches adultes. Dans des cultures de cellules dérivées de souris $Ptc^{-/-}$ traitées au tamoxifène deux mois auparavant, une augmentation de 4 à 5 fois des paires symétriques Glast+/EGFR- est

observée au dépens des paires symétriques Glast+/EGFR+ comparé aux contrôles (**Figures 28A à 28F et 29**). La délétion de Ptc dans les cellules souches neurales dérivées de la SEZ favorise donc la formation de cellules souches neurales Glast+/EGFR- symétriques. L'absence de diminution significative de paires symétriques

5 Glast+/EGFR+ suggère que l'activation pharmacologique de Smo dans les neurosphères contrôles n'est pas complètement comparable à l'inactivation *in vivo* de Ptc en ce qui concerne le mécanisme d'auto-renouvellement des cellules souches neurales Glast+/EGFR- et les cellules souches neurales actives.

Les inventeurs ont réalisé des expériences de pulsation de BrdU dans une population

10 de cellules en cycle cellulaire exprimant Ki67 dans la SEZ d'animaux ayant reçu une dose de tamoxifène deux mois auparavant. Une pulsation de BrdU de 2h montre une prolifération des TAP et dans une moindre mesure des neuroblastes. Ce protocole a permis aux inventeurs de déterminer que l'index de marquage n'est pas modifié par l'inactivation de Ptc (**Figures 30A à 30C et 31**). Les inventeurs ont également évalué le

15 nombre de cellules sortant du cycle cellulaire lors que les animaux sont tués 24h après l'injection de BrdU. La quantification du nombre de cellules en prolifération restant en cycle 24h après incorporation du BrdU (cellules Ki67+) montre un pourcentage de 2 fois moins de cellules sorties du cycle cellulaires dans les souris Ptc^{-/-} que dans les contrôles (**Figure 32**). Ces résultats montrent que la délétion de Ptc diminue le nombre

20 de cellules sortant du cycle cellulaire proliférant rapidement et donc leur capacité à différencier.

Ptc est nécessaire à la reconstitution de la niche de cellules souches de la SEZ après un traitement *in vitro* à l'AraC.

Les inventeurs ont testé dans les animaux Ptc^{-/-} et témoins traités au tamoxifène 6 mois

25 auparavant le taux de cellules souches neurales restant après traitement à l'antimitotique AraC, agent qui tue les cellules souches en prolifération, les T et le neuroblastes proliférant, mais préserve les cellules souches neurales quiescentes. Après une inactivation transitoire de la neurogénèse par traitement à l'AraC, la SEZ endommagée est régénérée par des cellules souches neurales de type astrocyte

30 résultant de l'augmentation de la prolifération et de la genèse de cellules souches neurales actives et de TAP. Immédiatement après le traitement à l'AraC (Jour 0), les cellules ayant incorporé le BrdU sont majoritairement absentes (**Figures 51 et 52**). Dix jours après (Jour 10), la population cellulaire BrdU+ est revenue à la normale dans les SEZ témoins comparé au placebo (**Figures 33A et 33B et 34**). Toutefois, le nombre de

35 cellules BrdU+ dans les SEZ Ptc^{-/-} est 3 fois plus bas après traitement à l'AraC comparé au placebo (**Figures 33C et 33D et 34**). Ces données montrent que, suite au traitement AraC, l'absence de Ptc inhibe l'activation des cellules souches neurales quiescentes et

inhibe leur induction vers des TAP. Aussi, Ptc est requis pour la régénération de la SEZ après lésion.

Discussion

L'inactivation conditionnelle de Ptc dans les cellules souches neurales permet d'étudier
5 l'activation de la signalisation Hh *in vivo* de manière indépendante du ligand dans la SEZ. Cette activation est médiée par la levée de l'inhibition de Ptc sur Smo et promeut la genèse de paires symétriques Glast+/EGFR- comme cela est observé *in vitro*.

De plus, les données des inventeurs suggèrent également une alteration de la transition entre les cellules souches neurales actives et les TAP, ce qui rend compte de
10 la diminution des TAP et par conséquent de la diminution des neuroblastes. L'expression de la voie Notch et des facteurs de transcription Sox2 et Sox9, connus pour inhiber la différenciation neurale est également augmentée. En relation avec cette altération de la transition entre les cellules souches neurales actives et les TAP, les inventeurs ont également constaté que les cellules souches neurales déficientes en Ptc ne
15 régénèrent pas correctement la SEZ après traitement avec un agent anti-mitotique.

L'activation soutenue de Hh dans les SEZ de souris Ptc^{-/-} maintient la pluripotence, mais influence la destinée des précurseurs dérivés de la SEZ vers soit un phénotype oligodendroglial dans le cc ou un phénotype glutaminergique ou dopaminergique, deux populations des interneurons de l'OB periglomérulaire, cette détermination étant d'un
20 grand intérêt dans les mécanismes de réparation du cerveau. L'activation à long terme de la signalisation Hh est toujours détectée un an après la recombinaison de Ptc. Cependant, l'absence d'altération majeure de la morphologie de l'OB observée par les inventeurs est en accord avec les données déjà rapportées montrant que la neurogenèse adulte dans la SEZ permet seulement un renouvellement partiel des
25 nouveaux neurones dans l'OB.

Les résultats des inventeurs montrent que l'interaction entre les voies de signalisation Hh et Notch dans la neurogenèse adulte peut contribuer au maintien des cellules souches neurales, inhibant ainsi leur transition vers les TAP. Une telle interconnexion a été proposée comme étant requise pour la régulation des divisions neurogéniques et
30 dans le développement d'une corticogenèse correcte. L'activation constitutive de la voie Hh par l'intermédiaire de la délétion Ptc dans les cellules de la crête neurale entérique active également fortement la voie Notch par l'intermédiaire de la surexpression de Hes-1 et induit une gliogenèse prématurée inhibant la formation par ces cellules de ganglions durant le développement du système nerveux entérique.

35 En accord avec l'interconnexion des voies Hh et Notch dans la SEZ adulte, les cellules souches neurales sont à la fois des cellules Hh- et Notch-. Si les facteurs de transcription Hes sont généralement considérés comme des effecteurs canoniques de

la voie Notch, une activité Hh/Hes1 indépendante de Notch a été décrite au cours de la prolifération des progéniteurs dans la rétine. Bien que le lien direct entre Hes1 et la voie Hh dans les cellules souches adultes reste inconnu, les résultats des inventeurs montrent que l'effet de l'activation de Hh est dépendant de Notch. Les TAP ont été
5 décrites comme régulant l'auto-renouvellement des cellules souches neurales *in vivo* et une interaction entre les voies de signalisation EGFR et Notch a été proposée comme ayant des rôles sélectifs dans ce processus où EGFR est un régulateur en amont de Notch par l'intermédiaire d'un mécanisme non autonome. Puisque l'inactivation conditionnelle de Ptc conduit à une grande diminution des TAP exprimant EGFR dans
10 la SEZ, la diminution subséquente d'EGFR pourrait amplifier l'induction de la voie Notch et être responsable des effets observés. Egalement, l'augmentation de Sox9 dans les mutant Ptc^{-/-} est en accord avec les résultats indiquant que la signalisation Hh active induit la transcription de Sox9 résultant en la capacité des cellules neuroépithéliale à former des neurosphères.

15 Bien que Ptc ait été décrit comme un gène suppresseur de tumeur, les inventeurs ont montré que sa délétion dans les cellules souches neurales de type astrocytaire augmente la capacité souche de ces cellules sans induire de formation de tumeurs. Une des explications est que Ptc contrôle les étapes majeures du maintien de cellules souches dans la SEZ : l'absence d'activité antagoniste sur Smo conduit à un blocage
20 des cellules prolifératives EGFR+, probablement par une augmentation des divisions symétriques des cellules souches neurales.

Les résultats des inventeurs montrent que les signaux médiés par Ptc sont impliqués dans la régulation de la genèse des cellules souches requises pour le maintien d'au
25 taux de neurogenèse normal. Plutôt que promouvoir l'expansion des cellules souches neurales et de leurs précurseurs, la délétion de Ptc est associée à un blocage de la prolifération des cellules EGFR+ conduisant à une quasi disparition de la neurogenèse. Ainsi, les souris *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}* sont un bon modèle pour évaluer la régulation et les mécanismes de transduction du signal dans les cellules souches de la SEZ, dans les conditions normales ou pathologiques. Ces souris sont d'un intérêt majeur pour
30 évaluer l'effet de Ptc dans le maintien des cellules souches neurales dans la zone subgranulaires de l'hippocampe.

Procédures expérimentales

Animaux. Sauf indications contraires, des animaux de 8 à 12 semaines ont été utilisés. Les souris *Glast-CreERT2* (Mori et al. 2006, *Glia* 54, 21-34) ont été reçues dans un
35 contexte génétique mélange 129 x C57BL/6 et croisées sur trois générations avec des souris de contexte génétique C57BL/6. La lignée de souris Patched floxé homozygote (Uhmann et al.; 2007, *Blood*, 110, 1814-1823) ont été reçues et maintenue dans un

contexte génétique C57BL/6. La lignée de souris rapporteuse *R26R-YFP/+* (Srinivas et al., 2001, BMC Dev. Biol. 1, 4) ont été maintenues dans un contexte génétique C57BL/6.

Les souris Glax-CreERT2 ont été croisées avec les souris Patched floxées. La descendance a alors été croisée avec les souris *R26R-YFP/+* comme décrit précédemment (Soriano, 1999, Nature 21, 70-71). Toutes les procédures ont été mises en œuvre selon les directives européennes 86/806/EEC.

Administration de tamoxifène et de BrdU. Le tamoxifène (Sigma) a été dissout dans de l'huile de maïs (Sigma) à une concentration de 10 mg/mL et 1mg a été injecté aux animaux par voie intrapéritonéale (i.p.) deux fois par jour pendant 5 jours consécutifs. Les animaux ont été sacrifiés 10 jours, 2 mois, 6 mois ou 12 mois après la fin du traitement au tamoxifène. Afin de marquer les cellules prolifératives, les souris ont reçu par voie i.p. une injection de bromodéoxyuridine (BrdU; Sigma; 100 mg/kg de masse corporelle) 4heures ou 2 heures avant le sacrifice (groupes de 5 à 6 souris). Pour la détermination de la sortie du cycle cellulaire, les animaux ont reçu deux injections i.p. de BrdU à deux heures d'intervalle et ont été sacrifiées 24h après la dernière injection.

Perfusion à l'aide de mini pompes osmotiques. Pour tuer les cellules proliférant rapidement dans la SEZ, de l'AraC (2% Sigma) dans un véhicule (0,9% de sel) a été perfuse dans le ventricule latéral de souris témoins et *Ptc^{-/-}* qui ont été traitées 6 mois auparavant avec du tamoxifène. Les inventeurs ont utilisé des mini pompes osmotiques (Alzet). Après 7 jours de perfusion, les pompes sont retirées et les souris tuées 10 jours après la fin du traitement AraC. N=4 par conditions. Des canules ont été implantées stéréotaciquement dans le ventricule latéral aux coordonnées suivantes : AP, 0.2 mm; ML, 0.8 mm; DV, -2.5 mm (en rapport avec Bregma).

Histologie et marquages immunologiques. Les animaux ont été perfusés, ou non, avec de la paraformaldéhyde à 4% et les sections de tissus ont été découpées au cryostat. Les anticorps utilisés sont décrits ci-après. Pour les marquages hématoxyline et éosine, l'hématoxyline (Vector) et l'éosine (Polysciences) ont été utilisés. Les noyaux sont marqués au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole ; Vector).

Hybridation *in situ* (ISH). Le protocole et la synthèse des sondes ribonucléiques *Ptc*, *Gli1* et *GFAP* ont été décrits précédemment (Traiffort et al., 1999, Eur. J. Neurosci. 11, 3199-3214). La sonde *Ptc* del correspond aux nucléotides 1025-1305 de *Ptc* murin (Genbank n° d'accension NM_008957.2). La sonde *vGlut2* a été décrite précédemment (Borgius et al., 2010, Mol. Cell. Neurosci. 45, 245-257).

Cultures de neurosphères. La SEZ télencéphalique a été disséquée à partir d'adultes sauvages, *Ptc^{-/-}* ou témoins (Pastrana et al., 2011, Cell stem cell 8, 486-498). Les fragments de SEZ ont été digérés dans une solution de papaïne 5sigma) et de trypsine

(Invitrogen) pendant 20 min à 37°C et dissociées mécaniquement par passage dans une aiguille d'épaisseur 26. Sans indications contraires, les cellules ont été ensemencées à 5000 cellules par puits dans des plaques 24-puits dans du milieu sans sérum consistant en du DMEM additionné avec du B27, de la pénicilline/streptomycine, 5 du sodium pyruvate et en présence de 20 ng/mL d'EGF et 10 ng/mL de facteur basique de croissance des fibroblastes (FGF, Invitrogen). Après 6 à 9 jours en culture, les sphères sont récoltées, incubées dans 0,05% de trypsine (Invitrogen) pendant 30 à 60 min à 37°C, sont dissociées mécaniquement et séparées en cellules uniques au travers d'une seringue comme décrit précédemment. Sauf indication contraire, les expériences 10 utilisant des cellules isolées ou des neurosphères (traitées ou non avec des drogues) sont réalisées après un ou deux passages ou sur des sphères primaires.

Pour les expériences de multipotence, 5 à 10 sphères ont été cultivées sur des lamelles recouvertes de la poly-lysine (Sigma) dans le milieu dépourvu de sérum décrit ci-dessus pendant 7 jours.

15 Pour les études de fluorescence, les cellules ont été fixées dans 4% PFA à 4°C pendant 30 min, avant de bloquer pendant 30 min à température ambiante dans 0,5% de BSA dans du PBS. Les cellules fixées ont alors été incubées avec un anticorps primaire à température ambiante pendant 90 min, suivi par une incubation avec les anticorps secondaires pendant 60 min à température ambiante et montées sur des 20 lames.

Pour les tests de cellules appariées, des cellules isolées sont ensemencées directement après microdissection de la zone sous ventriculaire (SVZ) sur des lamelles à une densité cellulaire d'environ 50 000 cellules par puits. Les cultures ont été maintenues pendant 24 à 36 h en présence de 10ng/mL d'EGF. Les analyses IHF sont 25 réalisées comme décrit ci-dessus. Environ 60 paires ont été étudiées dans chaque échantillon issu d'animaux sauvages ou mutants.

Drogues. Le SAG et le MRT-83 ont été synthétisées comme décrit précédemment (Roudaut et al, 2011, Mol. Pharmacol. 79, 453-460).

RT-PCR semi-quantitative. Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le kit Trizol 30 (Invitrogen) à partir de cultures de sphères dérivées d'animaux traités au tamoxifène 2 mois auparavant. Les ARN ont subi une transcription inverse dans 20 µl de solution comprenant la reverse transcriptase Superscript II (Invitrogen). Les réactions de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées en utilisant la polymérase Go Taq (Promega). Les amorces spécifiques sont décrites ci-après. L'actine a été 35 utilisée comme témoin de charge des ARN.

Quantification et analyse statistique. Les signaux immunofluorescents ont été détectés par un microscope épifluorescent conventionnel (DMRXA2; Leica

Microsystems) équipé d'une caméra CDD (Photometrics) or scannée pour les plans Z pour la colocalisation par un microscope ApoTome (ZEISS) et le logiciel AxioImager. Les sections optiques sont de 1µm d'intervalle. Les signaux immunofluorescents sont quantifiés avec le logiciel Image. Les comptages cellulaires sont présentés en tant que
5 moyennes de plusieurs coupes de SEZ ou bulbes olfactifs d'au moins trois souris pour chaque groupe. Les analyses statistiques sont réalisées en utilisant un test bilatéral *t* de Student. Une signifiante statistique est considérée pour $p < 0.05$.

Analyses par western blot. Les cervelets de souris P5 OF1 (Charles Rivers, Saint-Germain sur l'Arbresle, France) ont été homogénéisés. Les protéines dérivées du culot
10 obtenu après 20 min de centrifugation à 9000 g ont été séparé par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 8% comme décrit précédemment (Coulombe et al., 2004, Mol. Cell. Neurosci. 25, 323-333). Ptc murin est détecté avec un antisérum polyclonal (130Ab, 1:1000; Bidet et al., 2011). Les expériences de blocage ont été réalisées en incubant toute la nuit l'antisérum avec une protéine de fusion recombinante purifiée
15 GST-Ptc (glutathione-S-transferase Ptc) à une concentration de 15 µg/mL.

Analyses par TUNEL. Les marquages TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end; ApoptagR Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit; Millipore) ont été réalisés en suivant les instructions du fabricant.

Anticorps utilisés pour l'immunohistofluorescence. Les anticorps anti BrdU, GFAP, NeuN, PSA-NCAM ont été décrits précédemment (Angot et al., 2008, Stem cells 26, 2311-2320). Les autres anticorps utilisés sont les suivants : anticorps issus de la chèvre dirigés contre c-fos (1/300; Santa Cruz), anticorps issus de lapin dirigés contre doublecortin (1/500, fourni par F. Francis), anticorps issus de souris dirigés contre Ki67 (1/300; BD Pharmagen), anticorps issus de cobaye dirigés contre Glast (1/100; Millipore), anticorps issus de souris dirigés contre Nestine (1/500; Millipore), anticorps
25 issus de lapin dirigés contre Olig2 (1/1000; Millipore), PDGFRα de rat (1/400; BD Pharmagen), anticorps issus de lapin dirigés contre Sox2 (1/400; Millipore), anticorps issus de la chèvre dirigés contre Sox9 (1/400; R&D systems), anticorps issus de lapin dirigés contre Tuj1 (1/500; abcam), anticorps issus de lapin dirigés contre Calbindine
30 (1/500, Swant). Les anticorps secondaires sont des anticorps conjugués de : chèvre anti-souris Alexa 546 (Molecular Probes), chèvre anti-lapin Alexa 555 (Life Technologies), âne anti-chèvre Alexa 546 (Life Technologies), chèvre anti-souris FITC (Sigma), cobaye DyLight 488 (Jackson immunoresearch), chèvre anti-rat Alexa 488 (Jackson Immunoresearch), âne marqué à la biotine anti-rat (biotinylée Vector Laboratories), âne anti-souris DyLight 649, âne anti-chèvre DyLight 649 ou âne anti-lapin DyLight 649 (Jackson Immunoresearch).

Séquences des amorces utilisées pour les RT-PCR semi-quantitatives

-37-

Notch1	sens:	5'-CCAGCATGGCCAGCTCTGG-3'	(SEQ ID NO : 1)
	antisens:	5'-CATCCAGATCTGTGGCCCTGTT-3'	(SEQ ID NO : 2)
Hes1	sens:	5'-AAAGACGGCCTCTGAGCACA-3'	(SEQ ID NO : 3)
	antisens:	5'-TCATGGCGTTGATCTGGGTCA-3'	(SEQ ID NO : 4)
Hes5	sens:	5'-AAGTACCGTGGCGGTGGAGATGC-3'	(SEQ ID NO : 5)
	antisens:	5'-CGCTGGAAGTGGTAAAGCAGCTT-3'	(SEQ ID NO : 6)
Gli1	sens:	5'-TTCGTGTGCCATTGGGGAGG-3'	(SEQ ID NO : 7)
	antisens:	5'-CTTGGGCTCCACTGTGGAGA-3'	(SEQ ID NO : 8)

Revendications

1. Mammifère transgénique non humain, présentant une invalidation fonctionnelle
biallèlique du gène codant le récepteur membranaire patched ou Ptc dans les cellules
5 souches neurales et/ou dans les cellules gliales, ledit mammifère ayant une masse
corporelle totale au moins 30% inférieure à la masse corporelle total dudit mammifère
transgénique ne présentant pas d'invalidation fonctionnelle dudit gène codant le
récepteur membranaire Ptc dans lesdites cellules souches neurales et/ou dans lesdites
cellules gliales, ledit mammifère ayant un génotype sauvage pour le gène Ptc, à
10 l'exception des cellules souches neurales et/ou des cellules gliales qui ont un génotype
Ptc^{-/-}.

2. Mammifère transgénique non humain selon la revendication 1, où lesdites cellules
souches neurales et/ou lesdites cellules gliales sont des cellules exprimant le gène
15 neural *Glast*.

3. Mammifère transgénique selon la revendication 1 ou la revendication 2, ledit
mammifère ayant un génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*, à l'exception des cellules souches
neurales et des cellules souches gliales qui ont un génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{-/-}*.
20

4. Cellule isolée de génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{-/-}*.

5. Mammifère transgénique non humain présentant le génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*.
25

6. Utilisation du tamoxifène pour l'invalidation, notamment *in vitro*, du gène Ptc dans
des cellules de mammifères de génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*.

7. Méthode d'inhibition de la différenciation, notamment *in vitro*, des cellules souches
30 neurales, comprenant une étape de mise en contact de cellules souches neurales
préalablement obtenues à partir d'un mammifère transgénique non humain présentant
le génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}*.

8. Utilisation du tamoxifène pour induire le blocage de la différenciation, en
35 particulier *in vitro*, de cellules souches neurales ou de cellules gliales, lesdites cellules
souches et cellules neurales présentant un génotype *Glast-CreERT2;Ptc^{-/-}*.

9. Méthode de modulation, notamment *in vitro*, de l'expression du gène Ptc dans des cellules souches neurales ou dans des cellules gliales, notamment des cellules souches isolées, ladite méthode comprenant une étape de mise en contact desdites cellules souches neurales ou desdites cellules gliales avec une dose efficace de tamoxifène, lesdites cellules souches neurales et/ou gliales présentant un génotype Glast-CreERT2;Ptc^{fl/fl}.

5

1/29

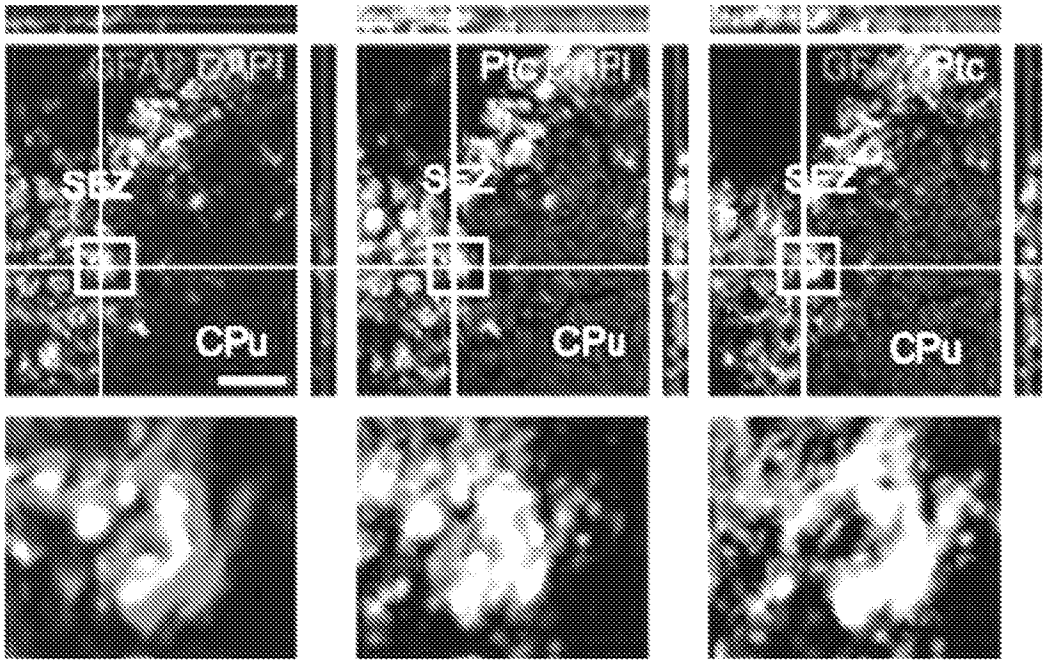


Figure 1A

Figure 1B

Figure 1C

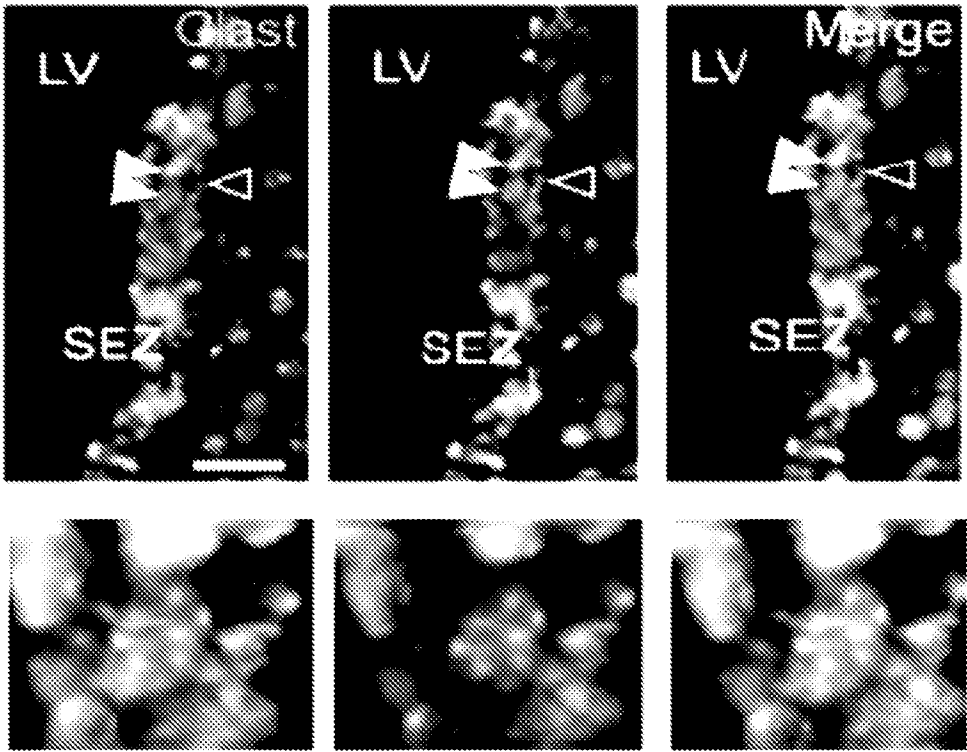
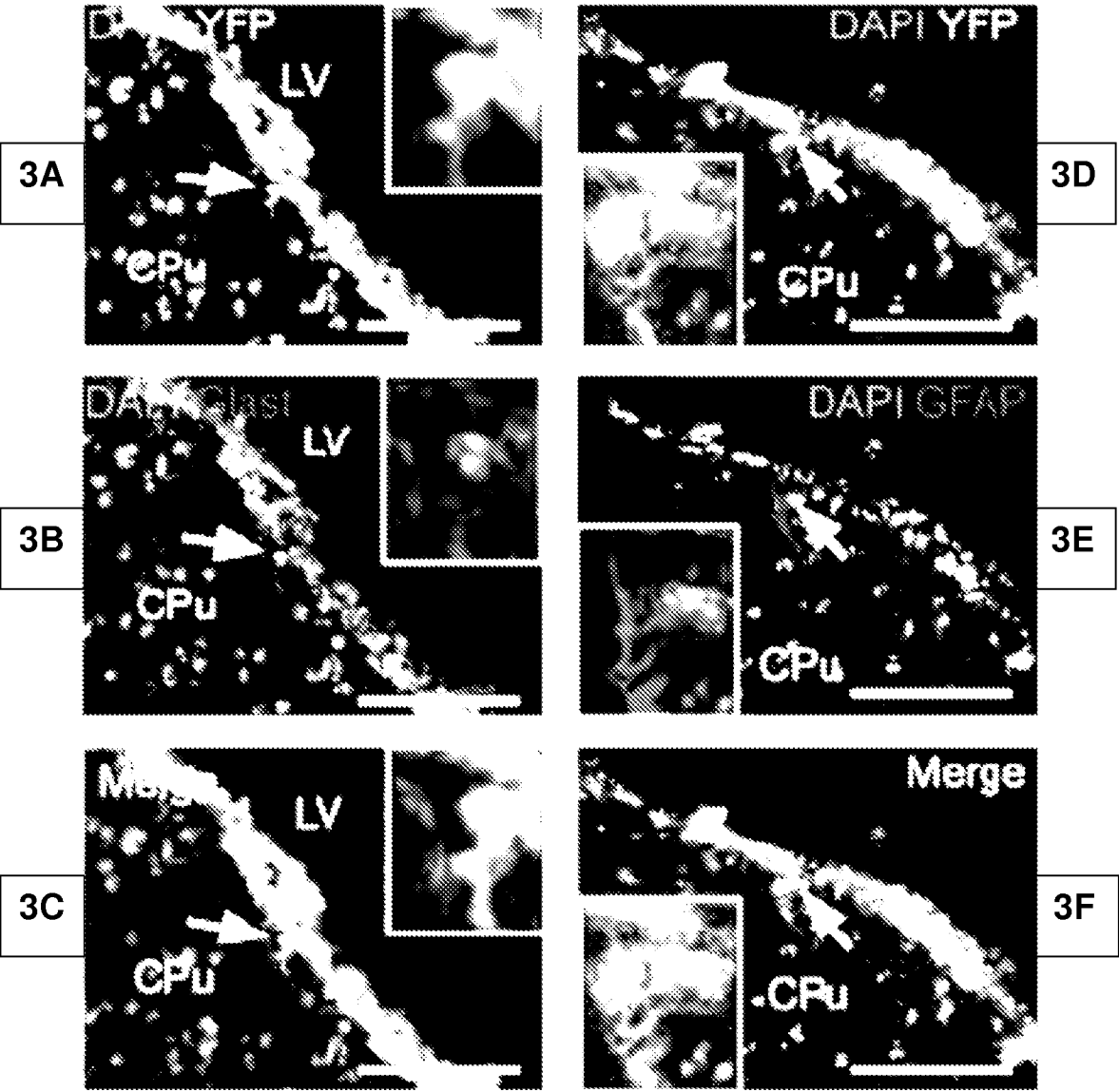


Figure 2A

Figure 2B

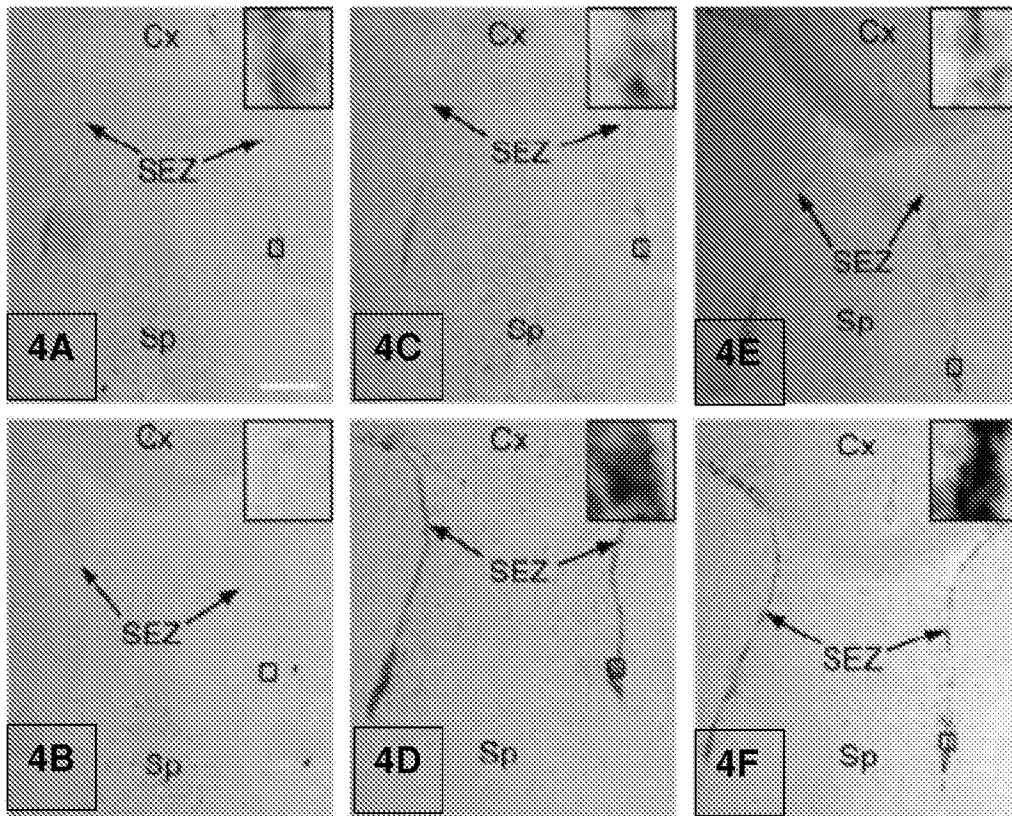
Figure 2C

2/29



Figures 3

3/29



Figures 4

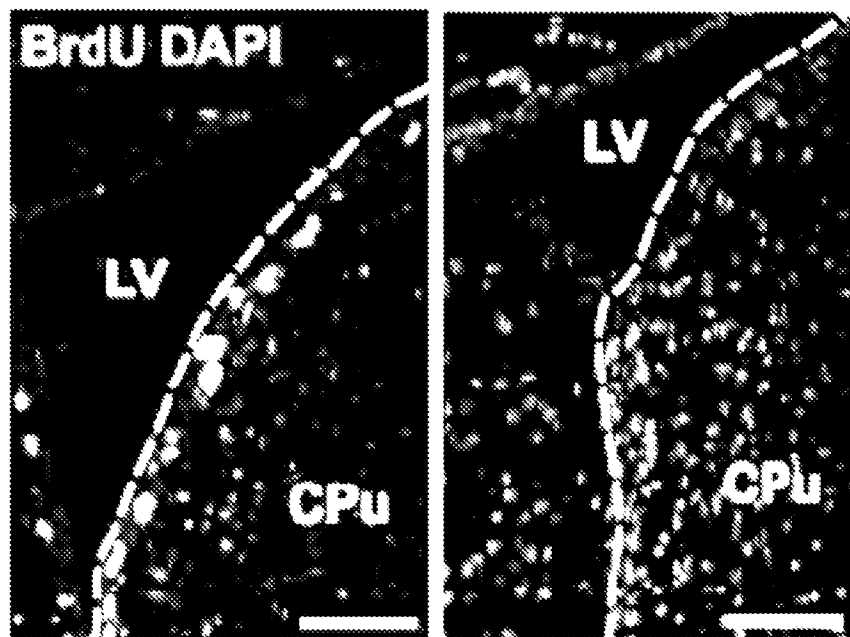


Figure 5A

Figure 5B

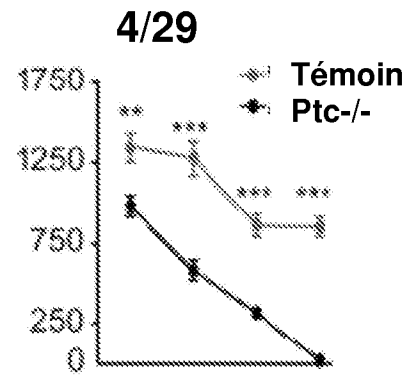
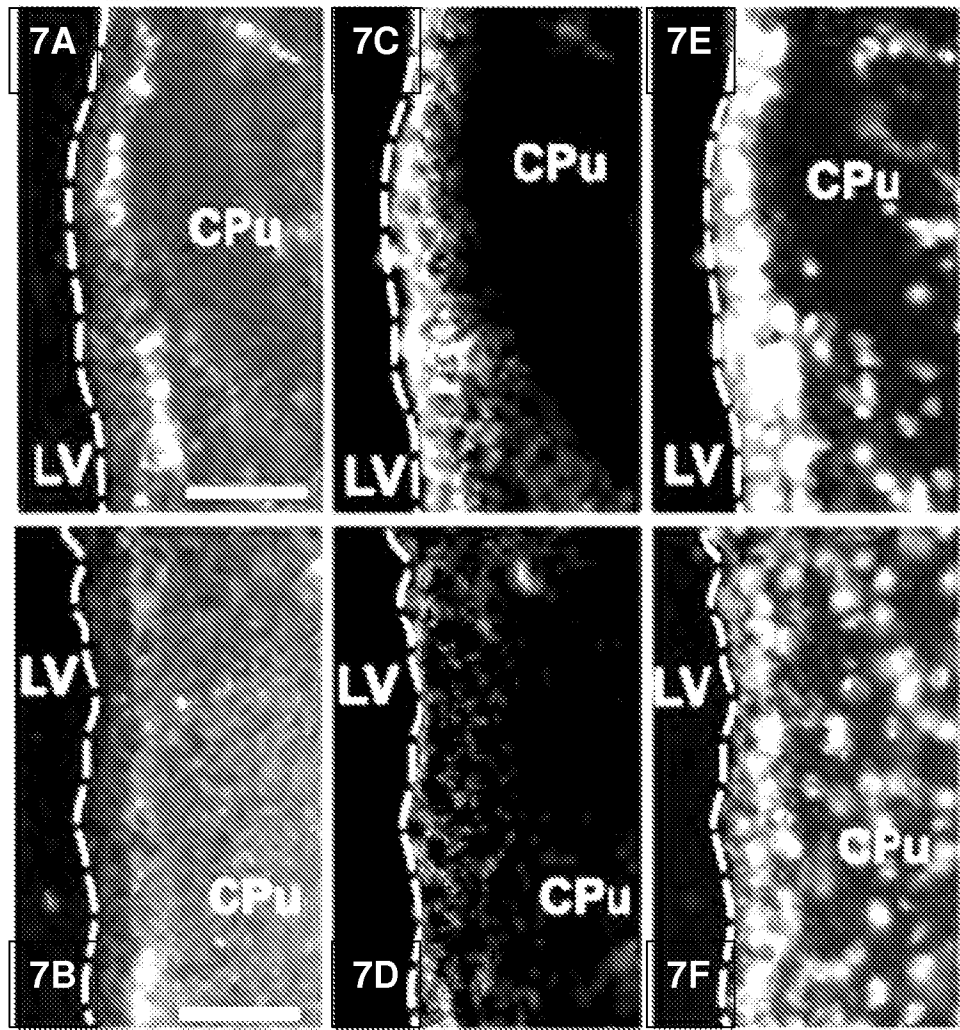
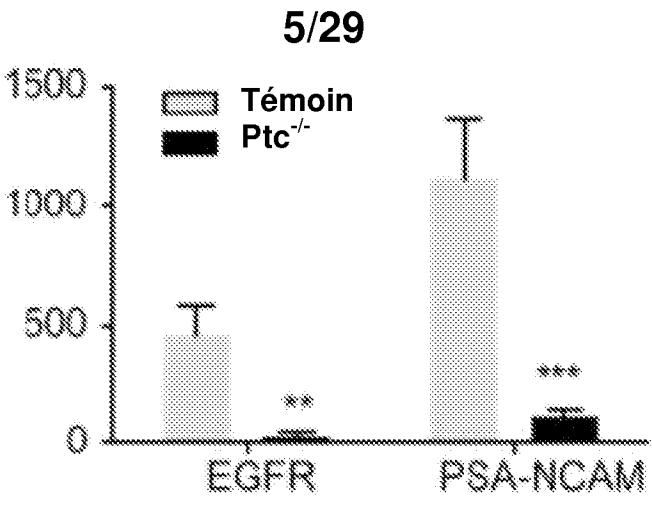


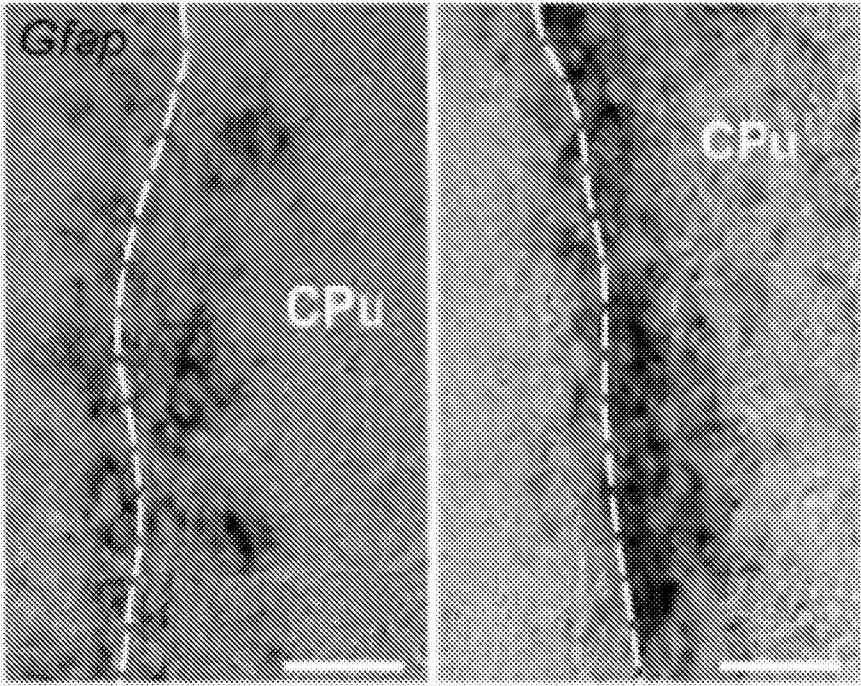
Figure 6



Figures 7



Figures 8



Figures 9A(2E)

Figure 9B

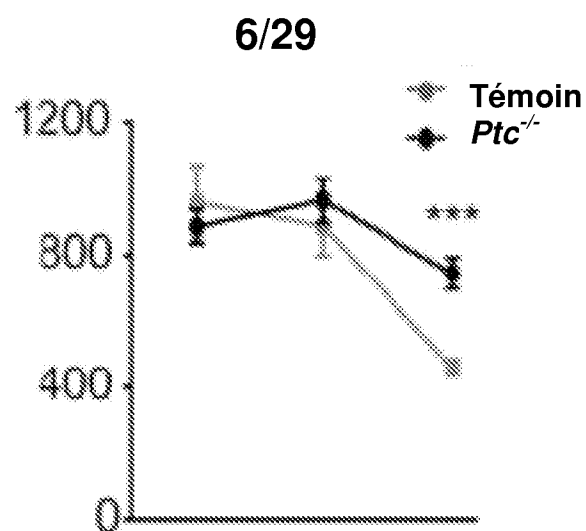
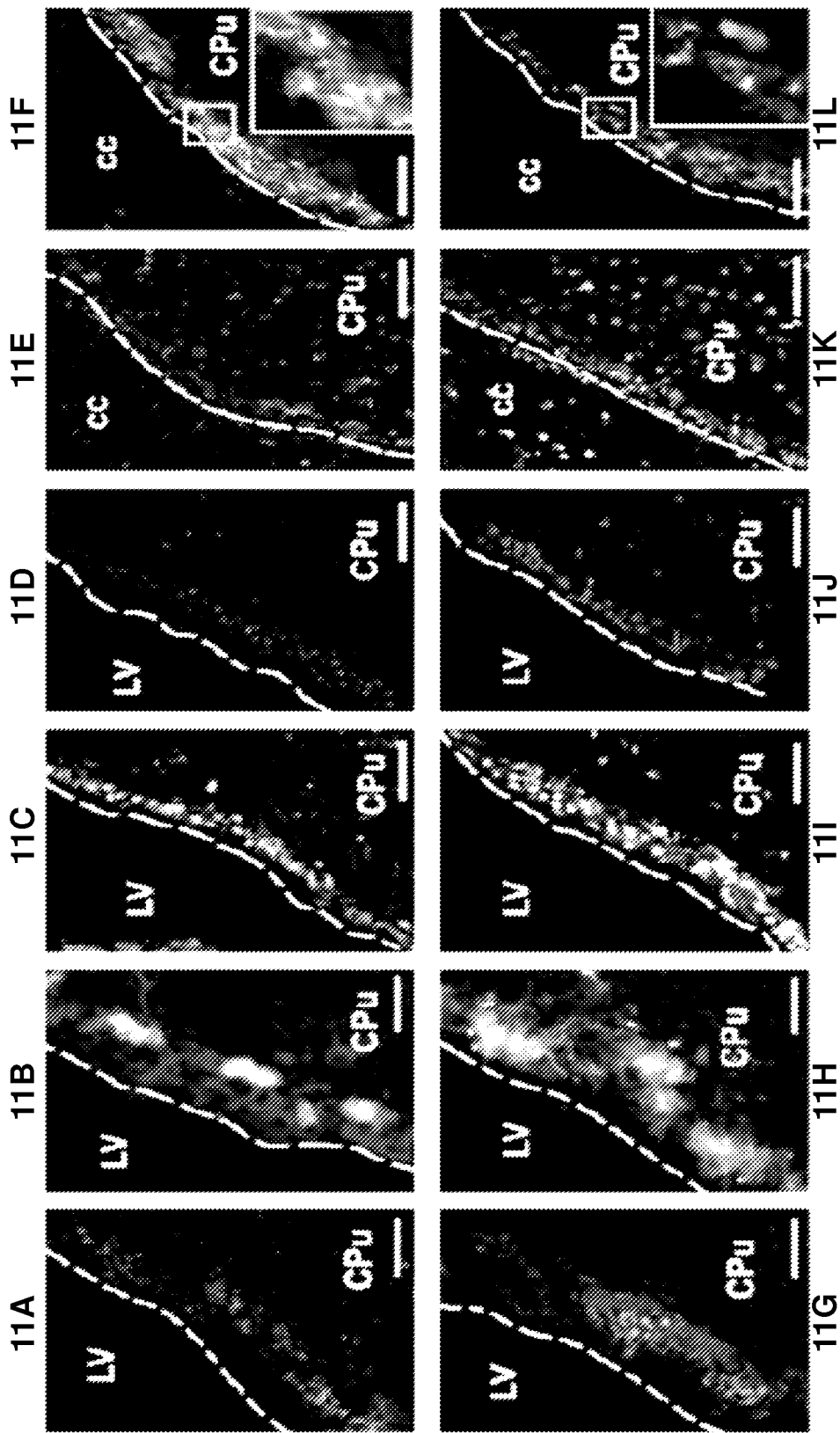


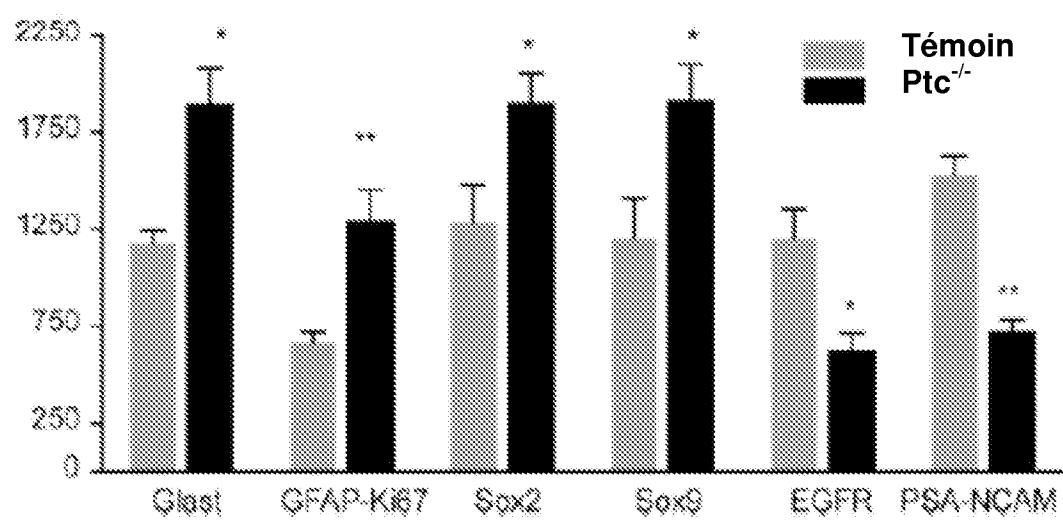
Figure 10

7/29



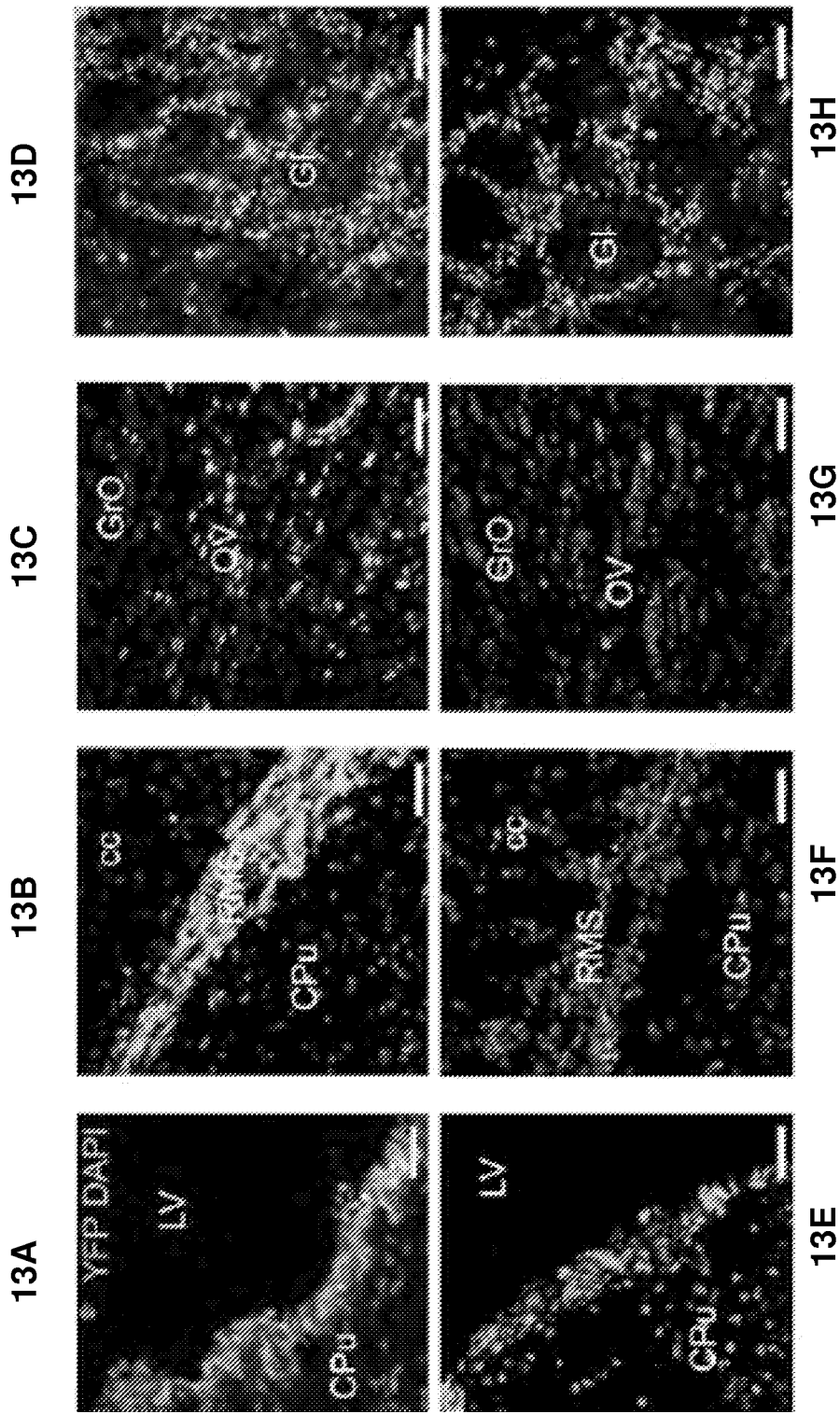
Figures 11

8/29



Figures 12

9/29



Figures 13

10/29

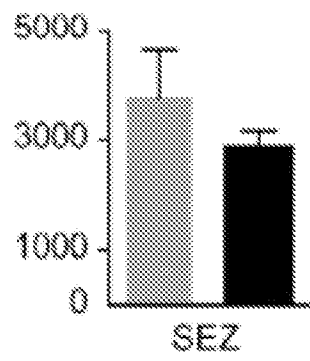


Figure 14A

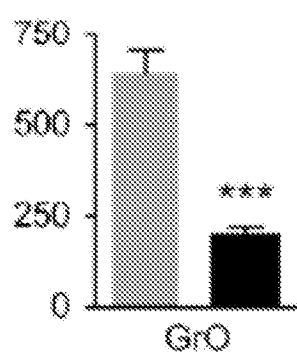


Figure 14B

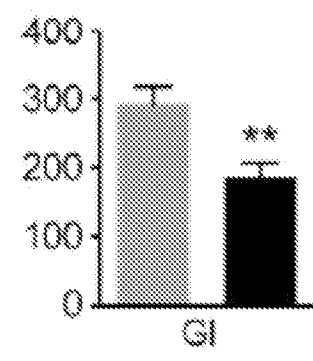
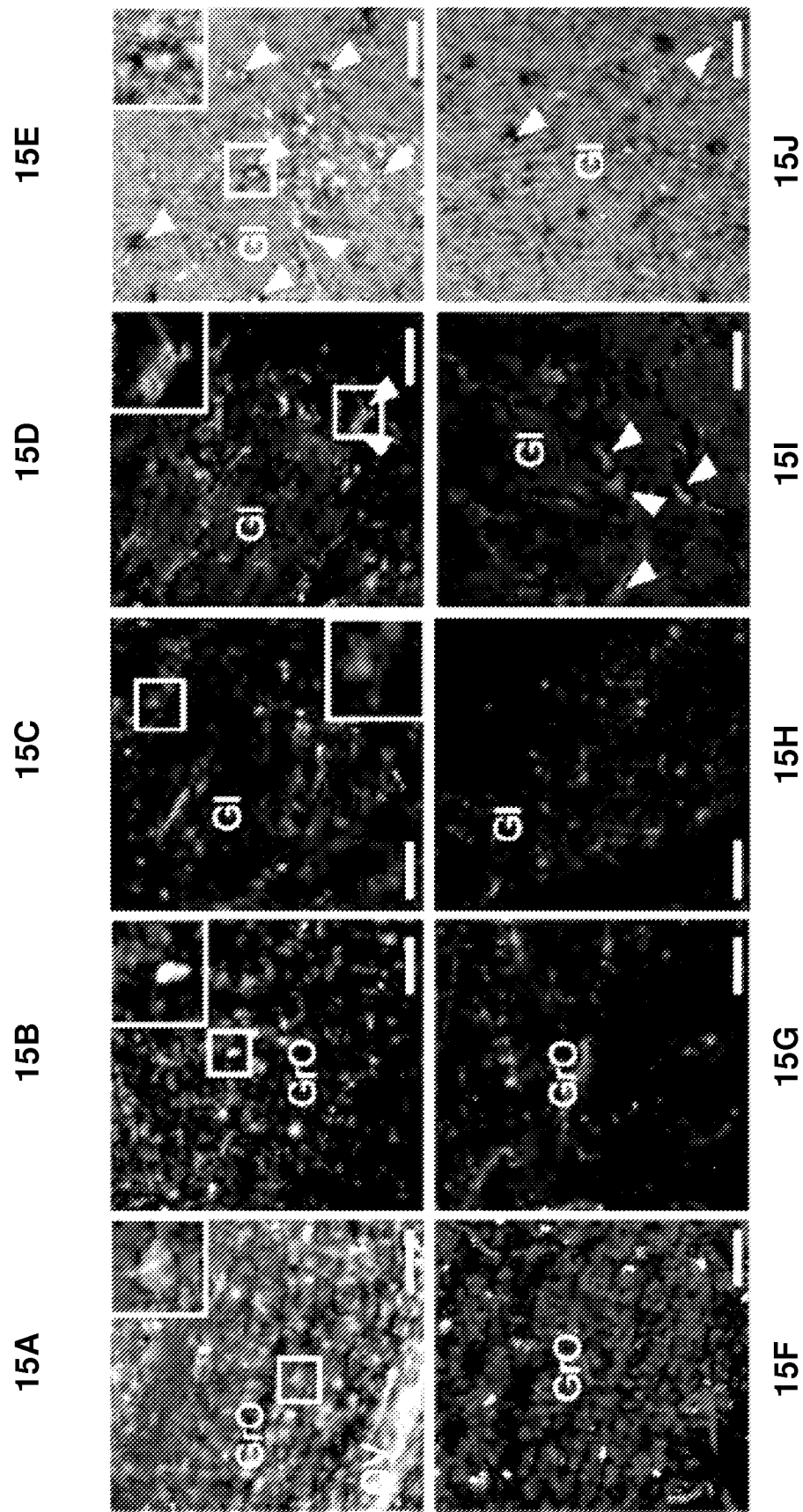
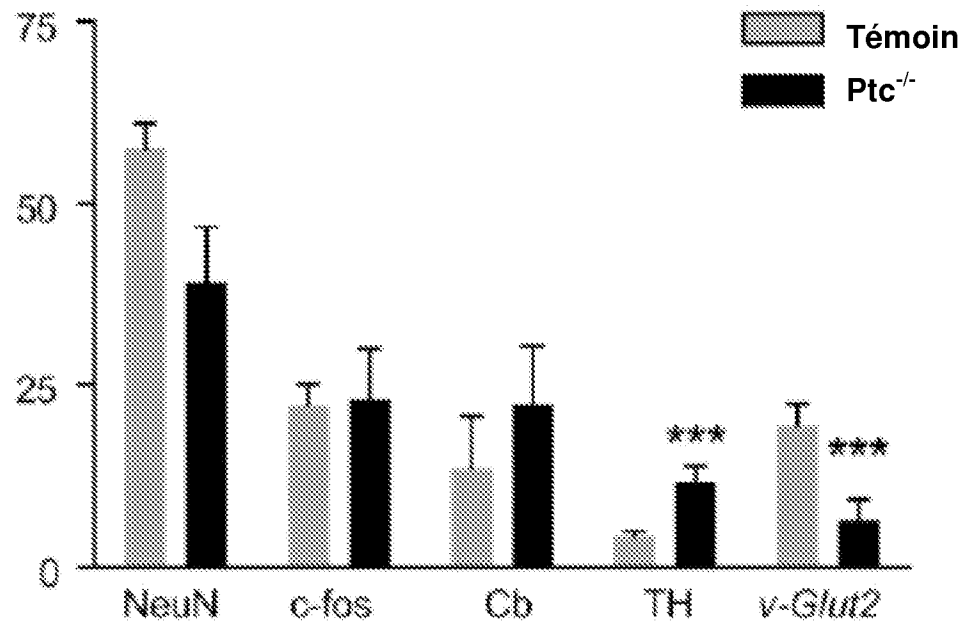


Figure 14C



Figures 15

12/29

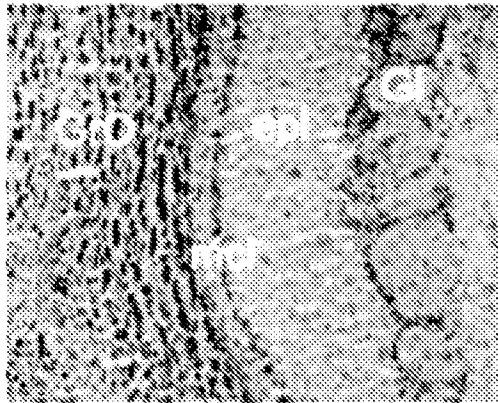


Figures 16

17A



17B



Figures 17

13/29

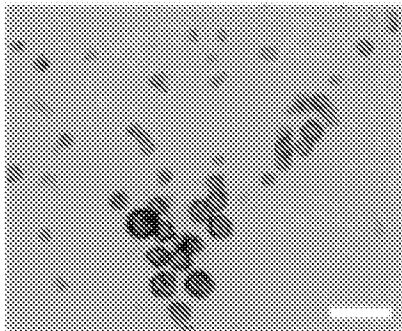


Figure 18A

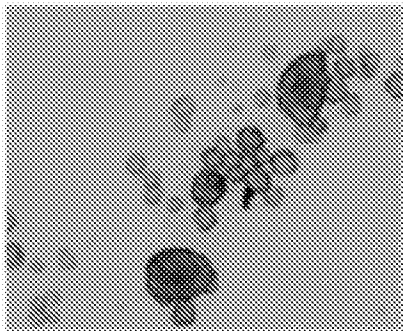


Figure 18B

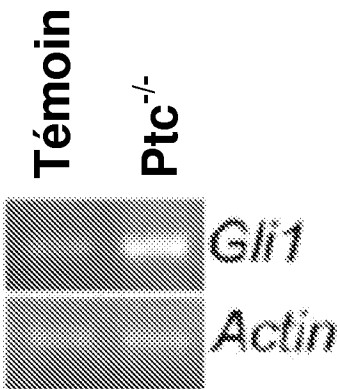


Figure 18C

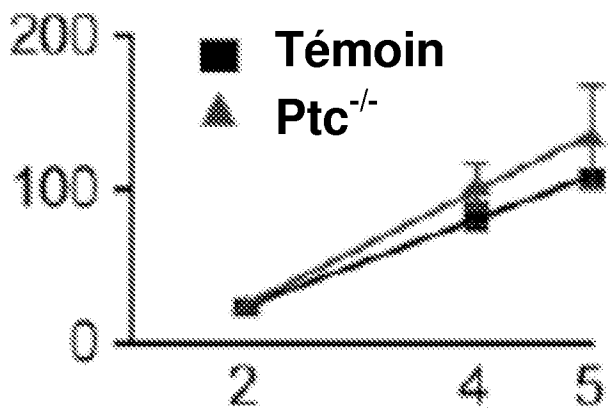


Figure 19

14/29

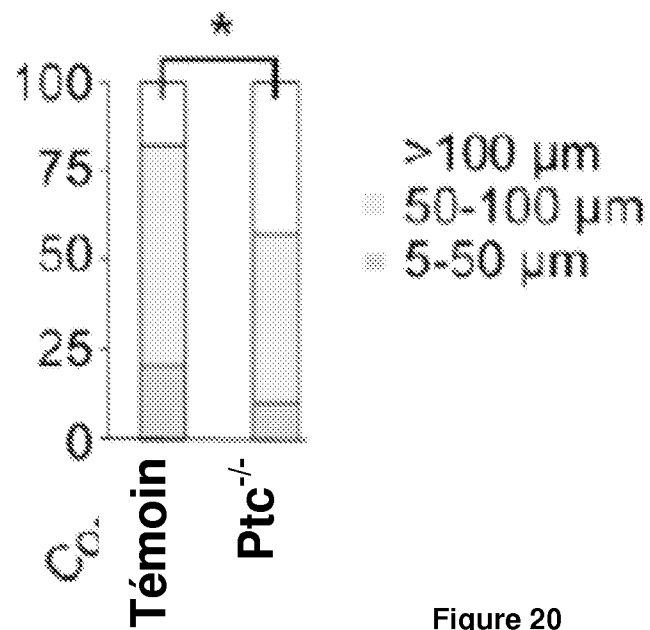


Figure 20

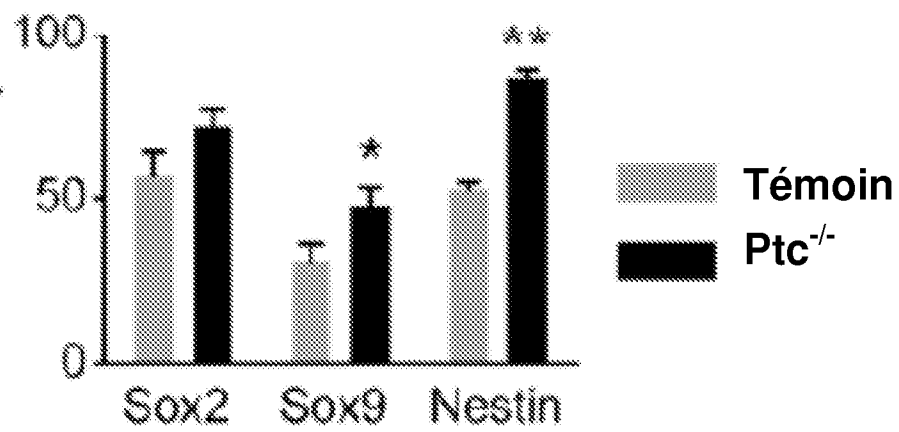


Figure 21

15/29

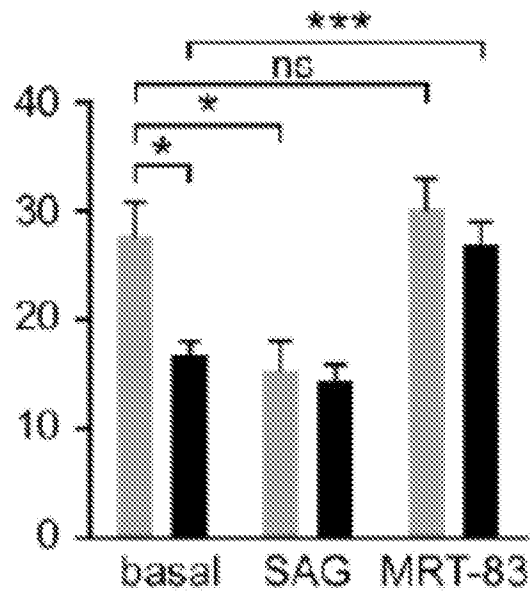


Figure 22

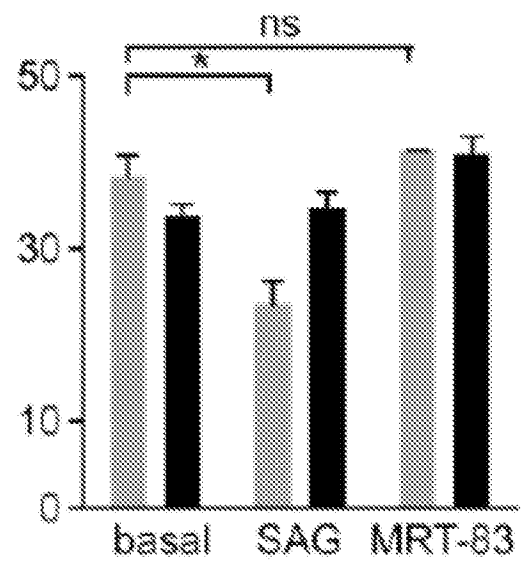


Figure 23

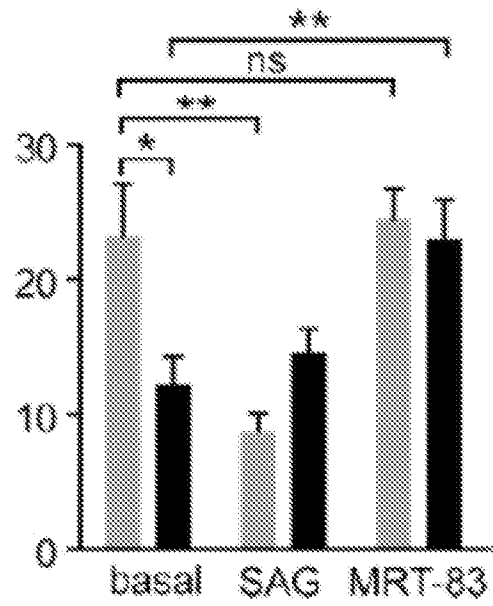
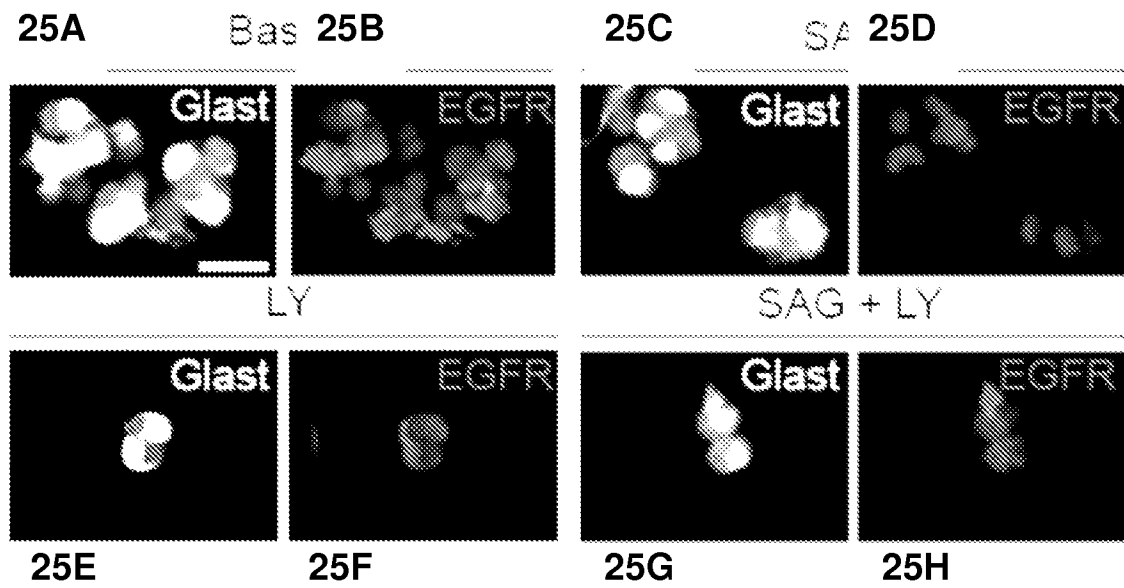
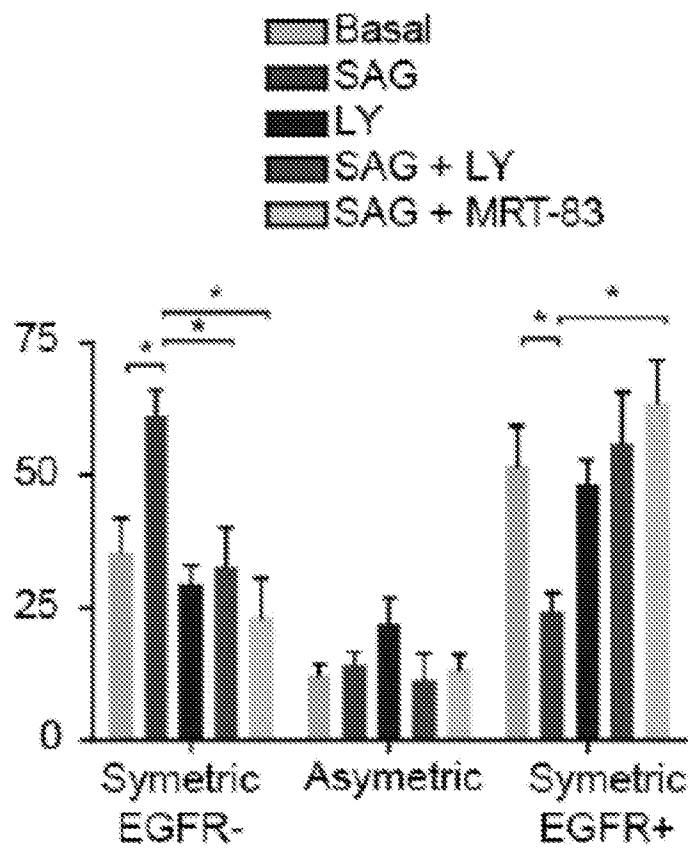


Figure 24

16/29

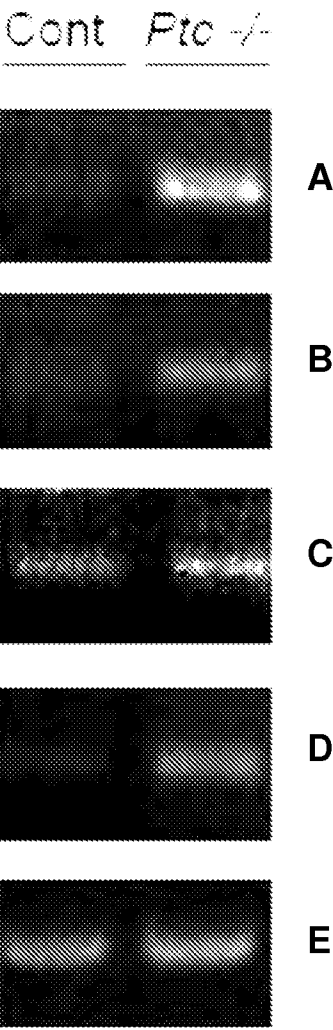


Figures 25

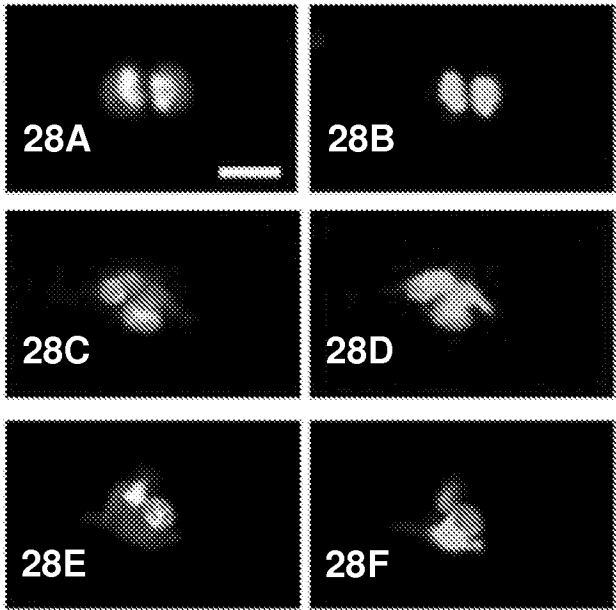


Figures 26

17/29



Figures 27



Figures 28

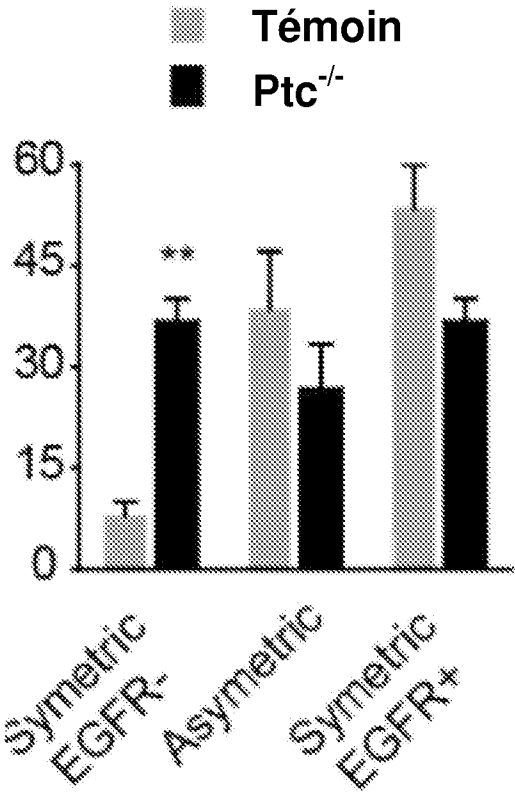
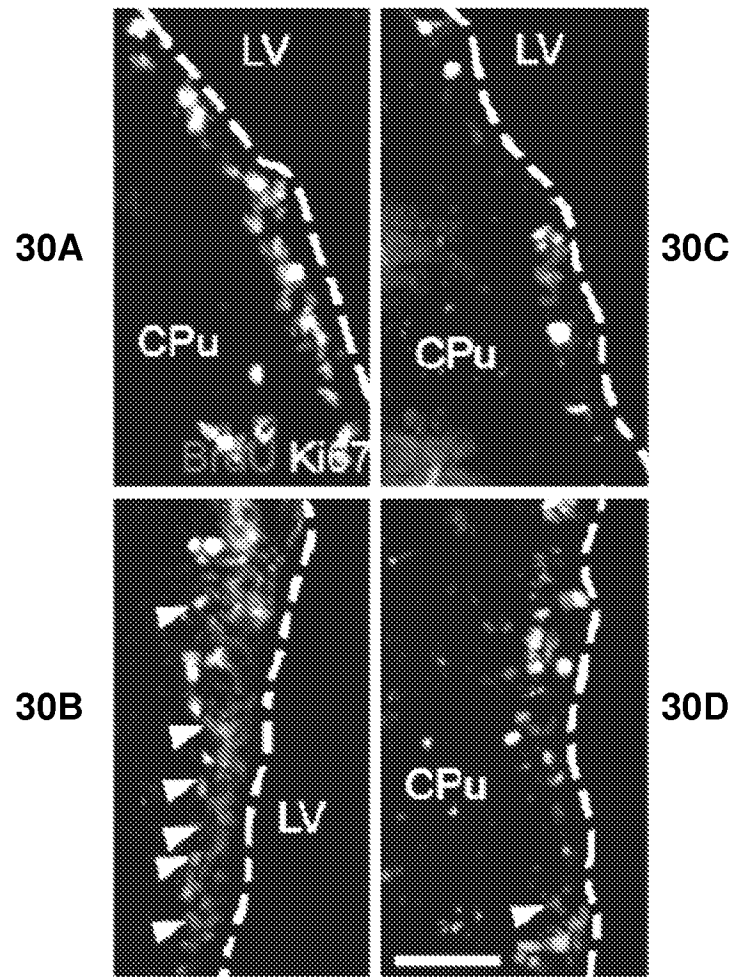


Figure 29

19/29



Figures 30

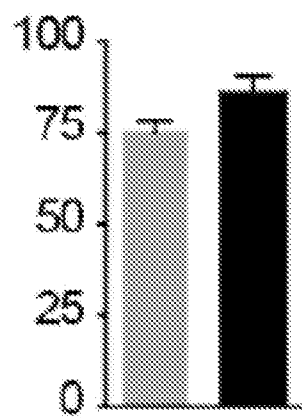


Figure 31

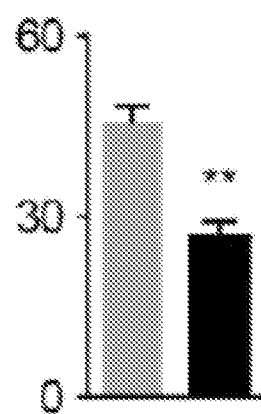


Figure 32

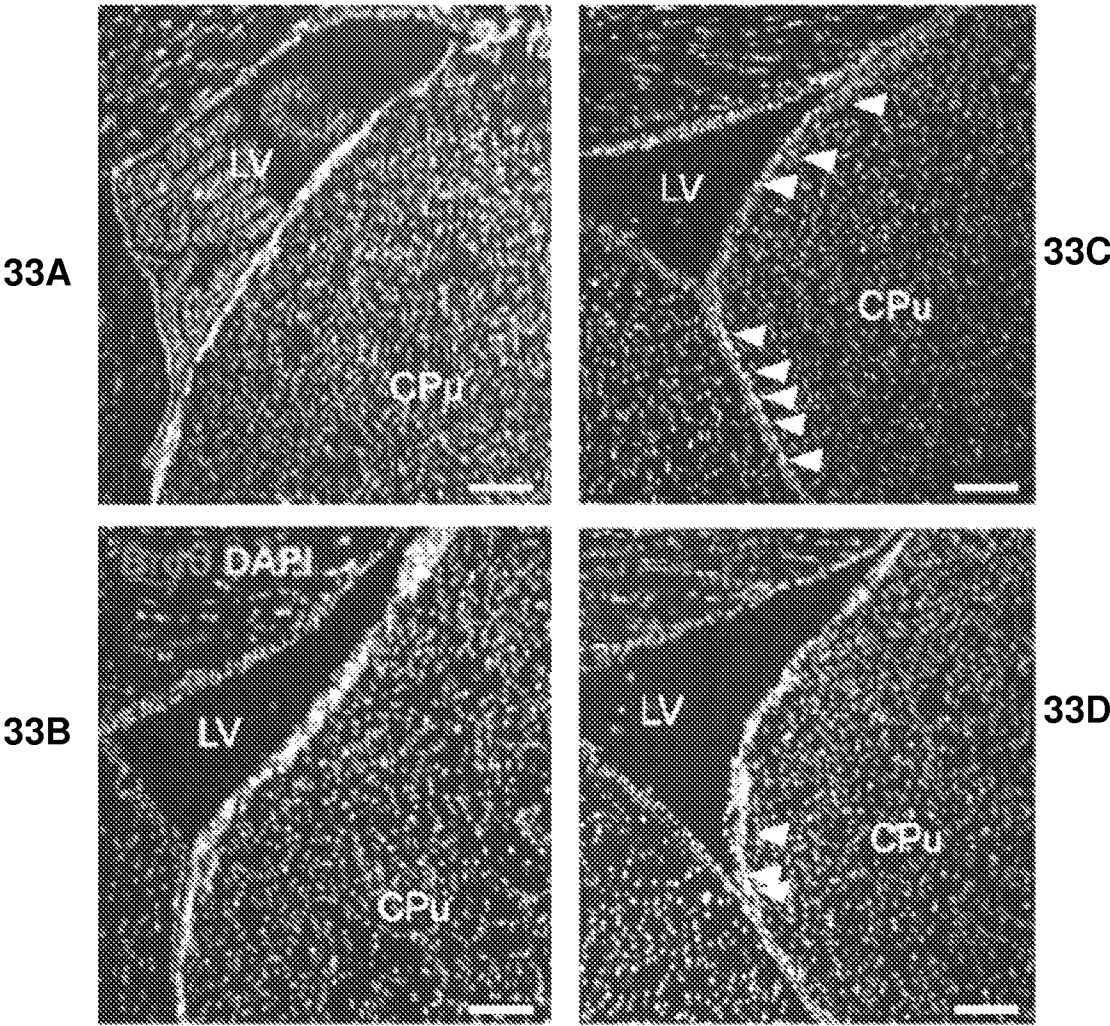


Figure 33

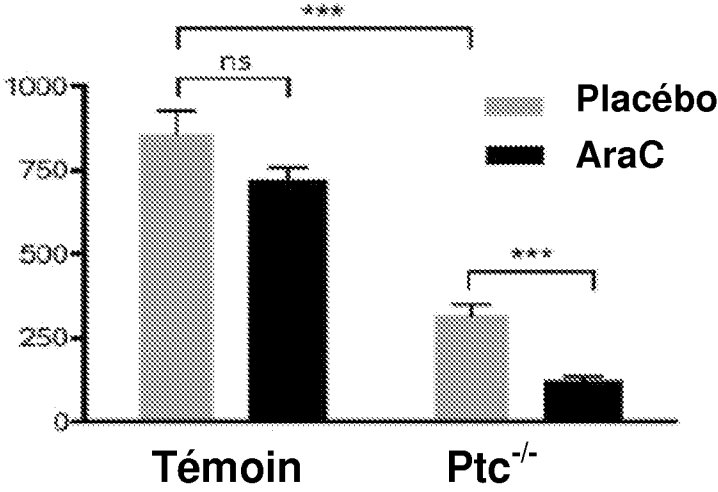


Figure 34

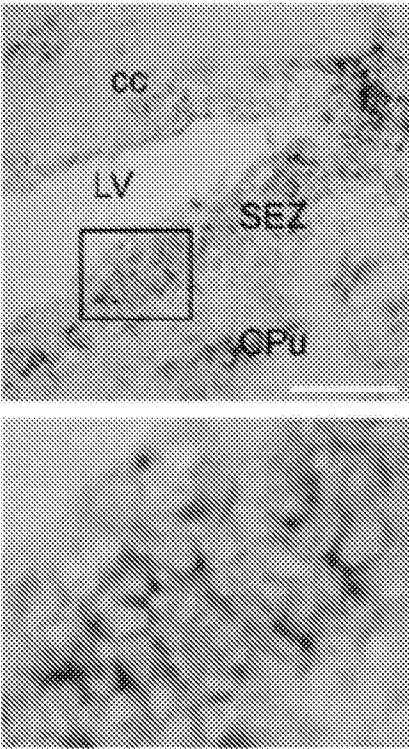


Figure 35

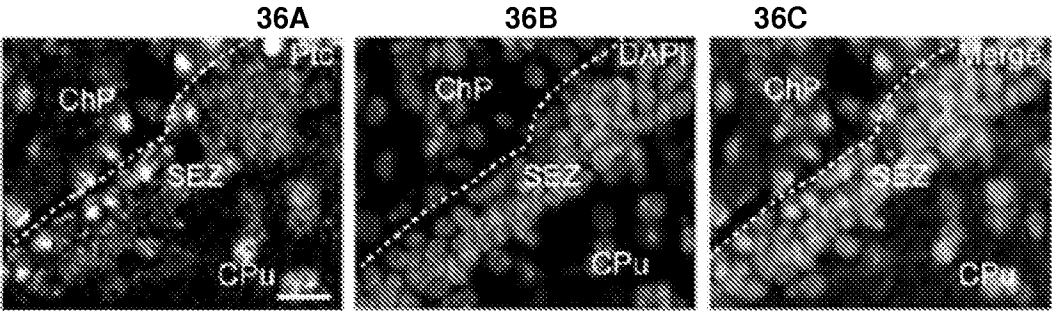


Figure 36

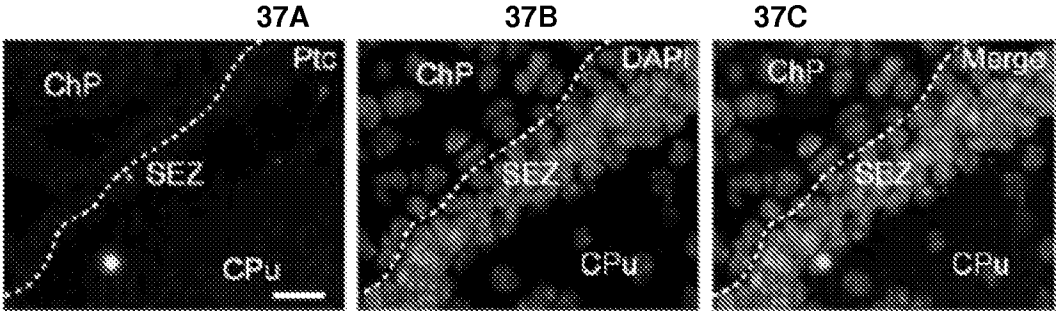


Figure 37

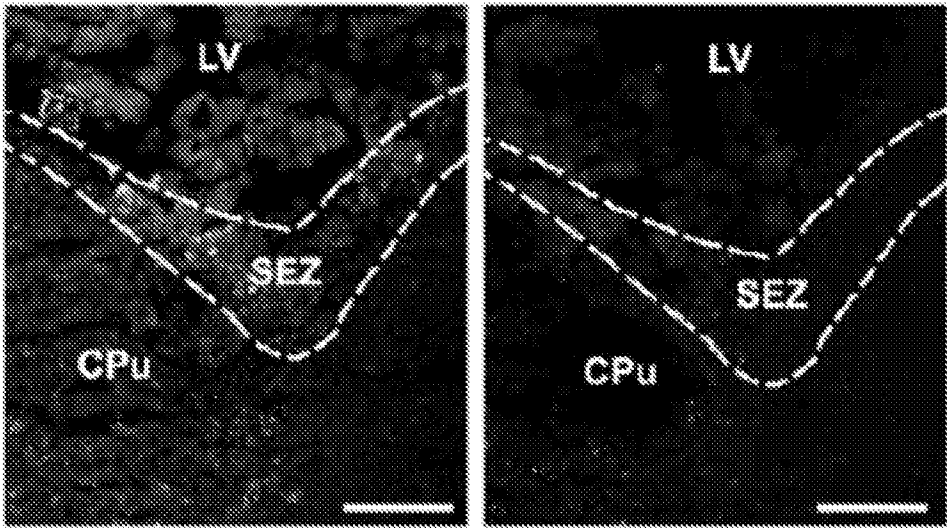


Figure 38

Figure 39

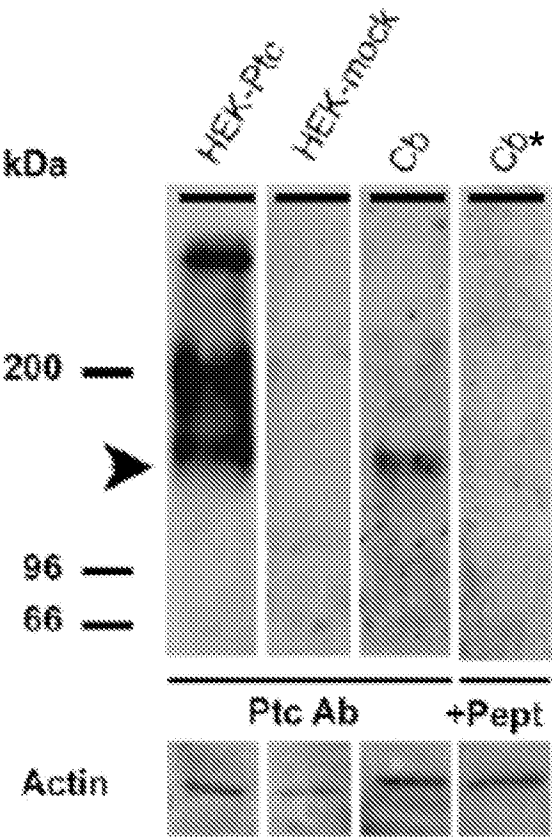
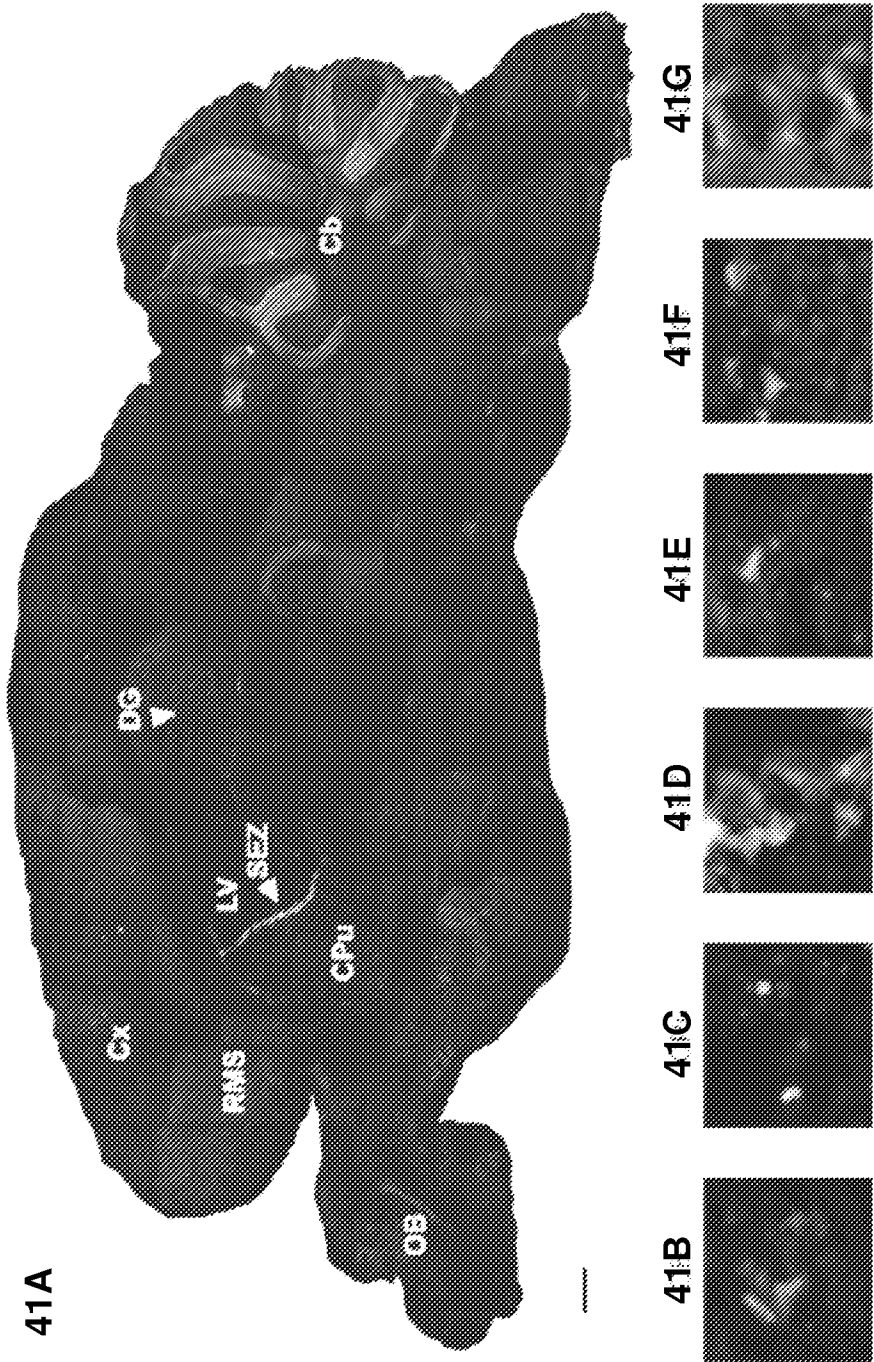
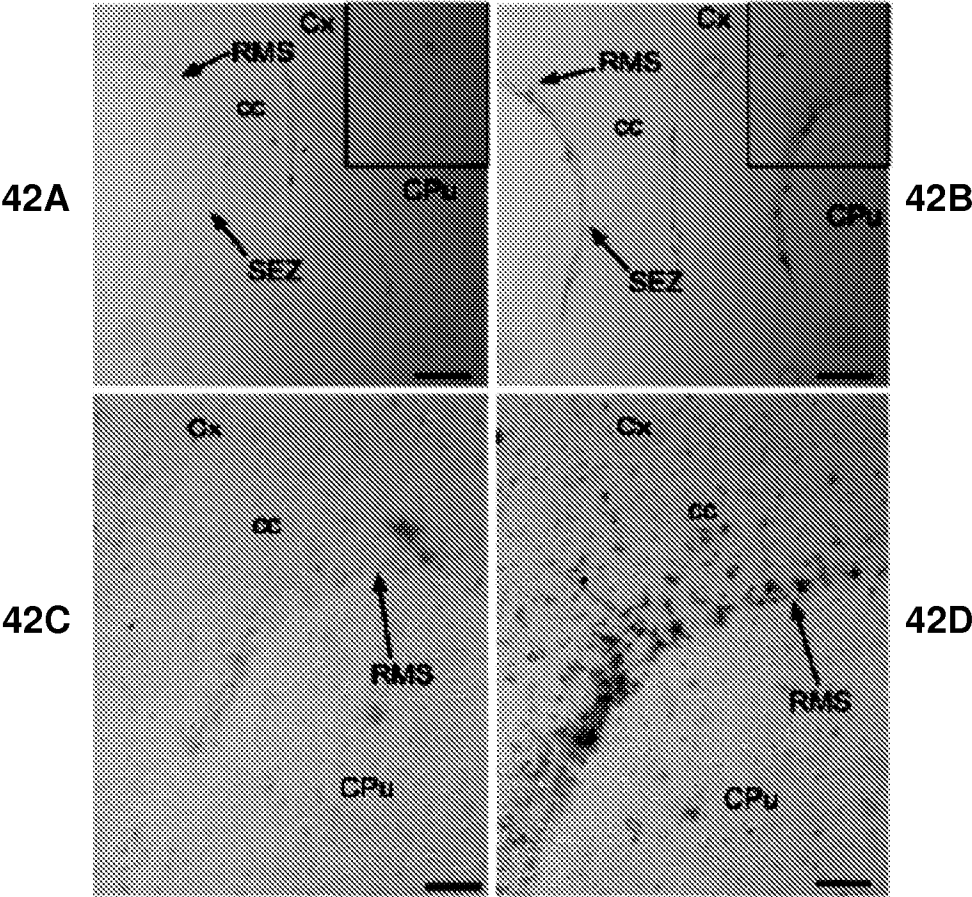


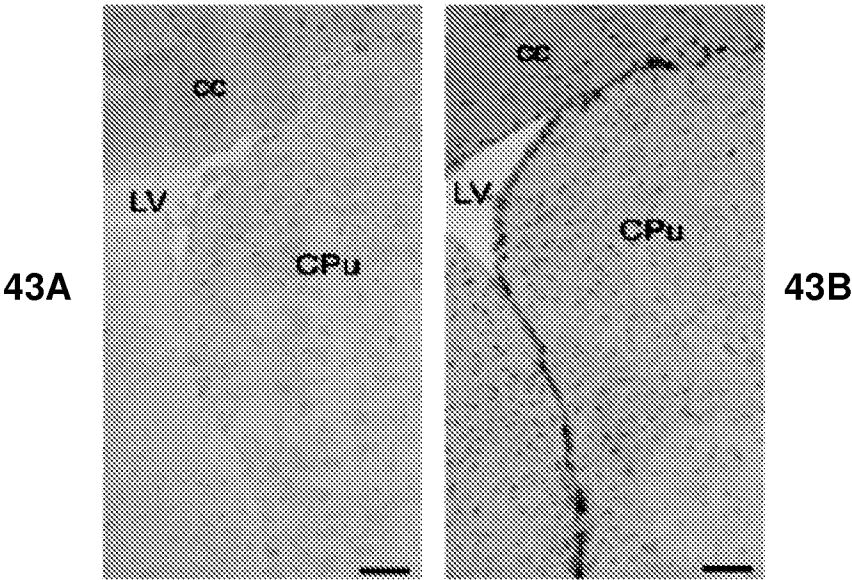
Figure 40



Figures 41

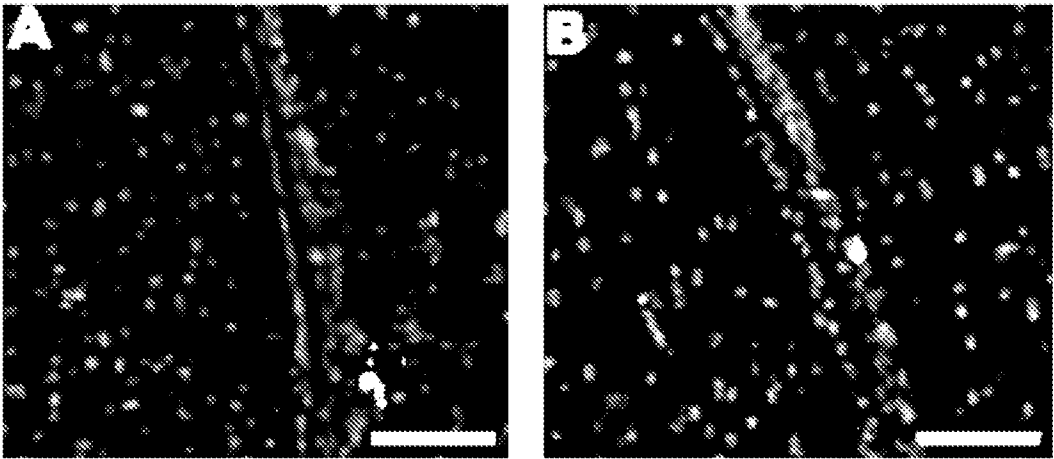


Figures 42



Figures 43

25/29



Figures 44

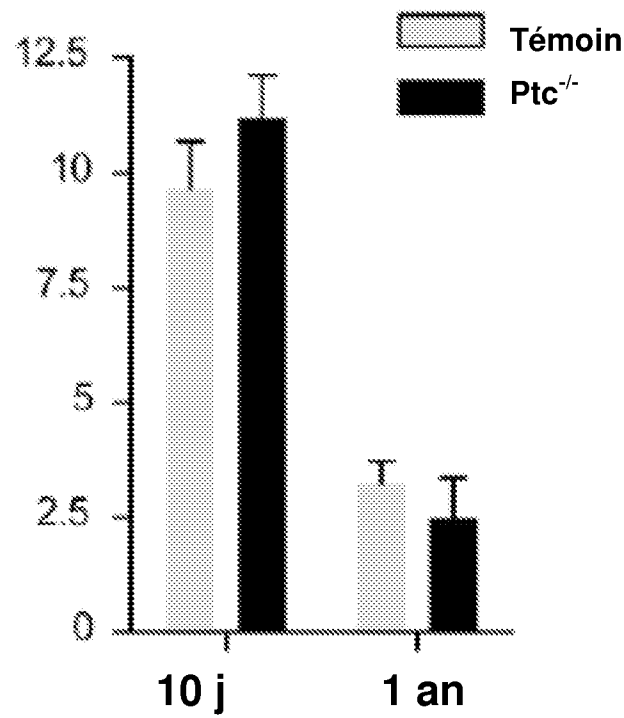


Figure 45

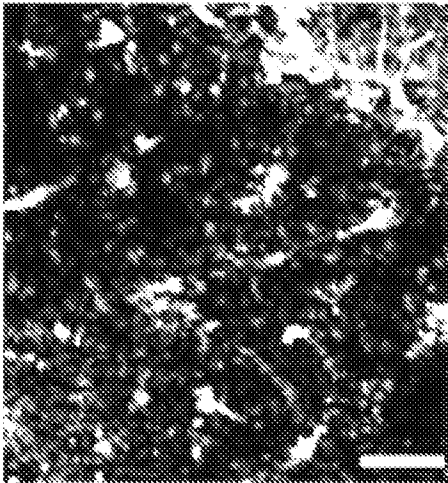


Figure 46A



Figure 46B

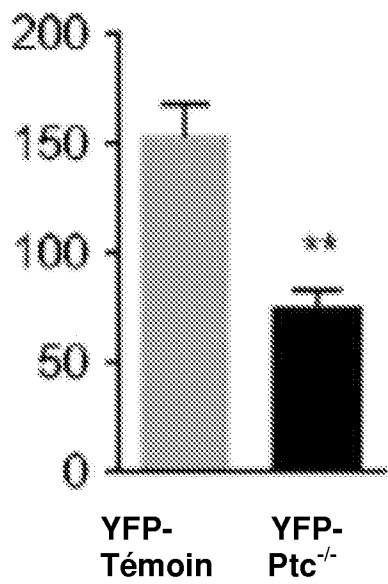


Figure 47

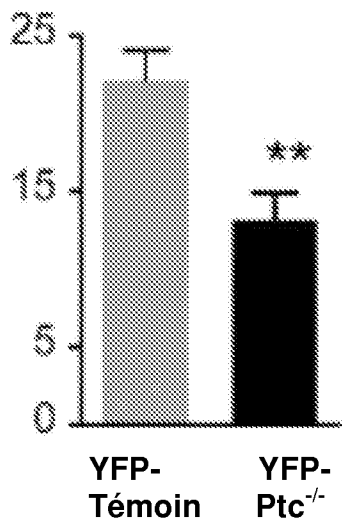
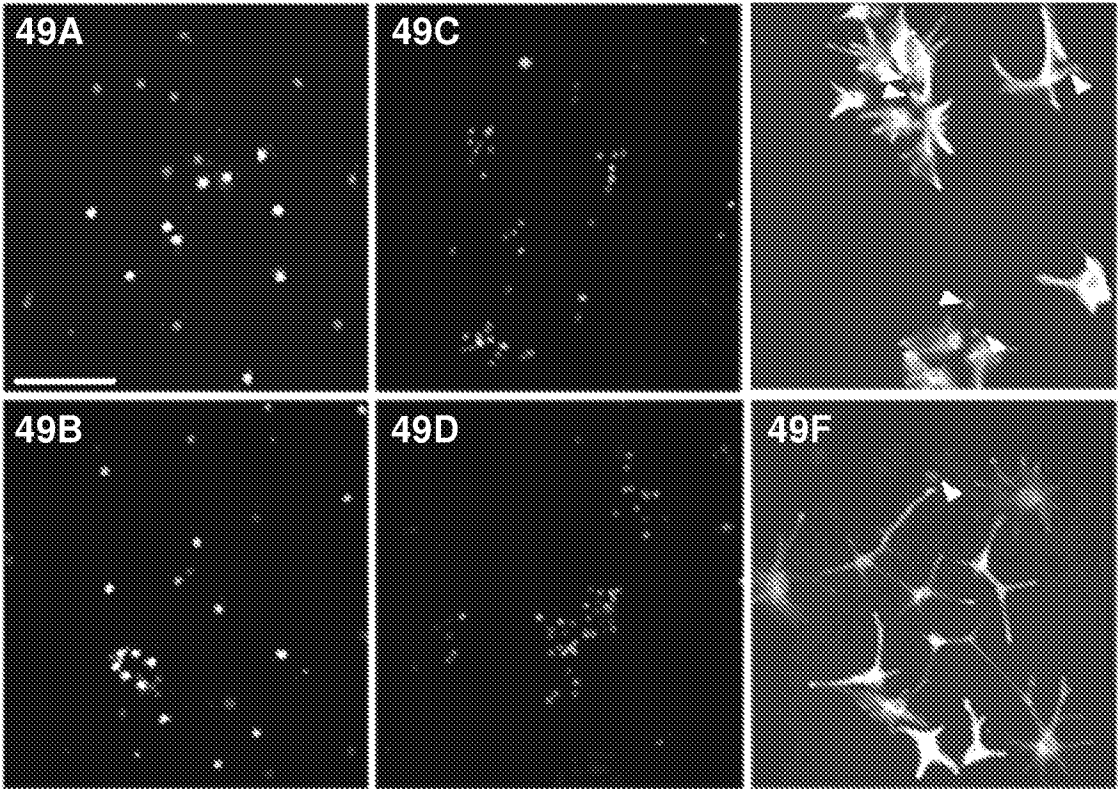


Figure 48



Figures 49

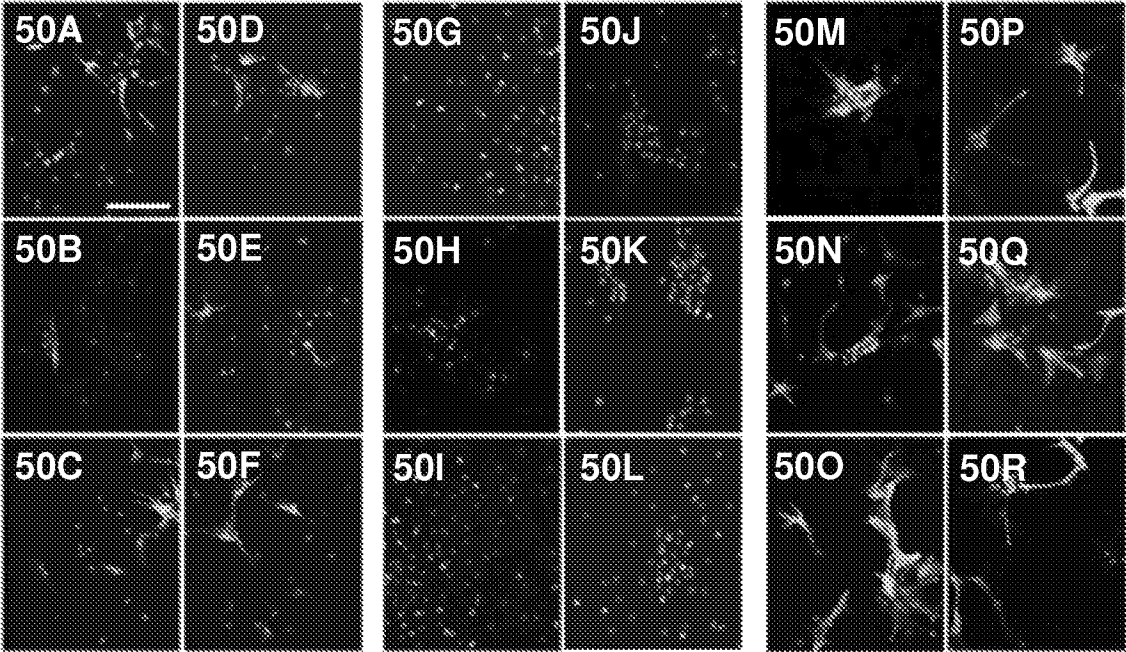
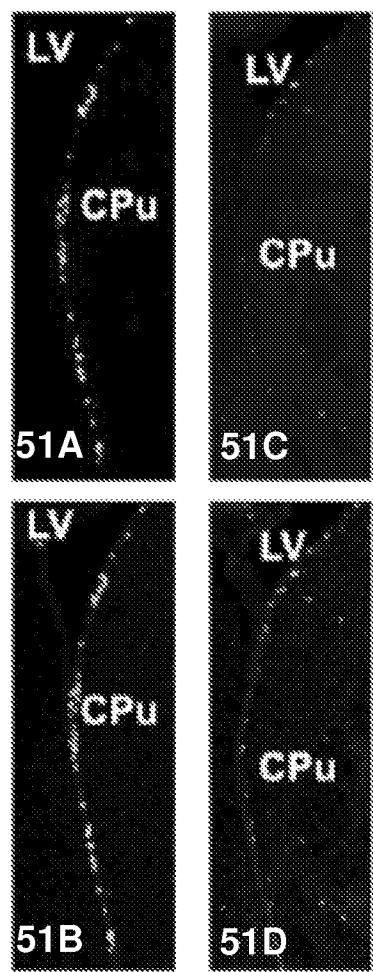


Figure 50



Figures 51

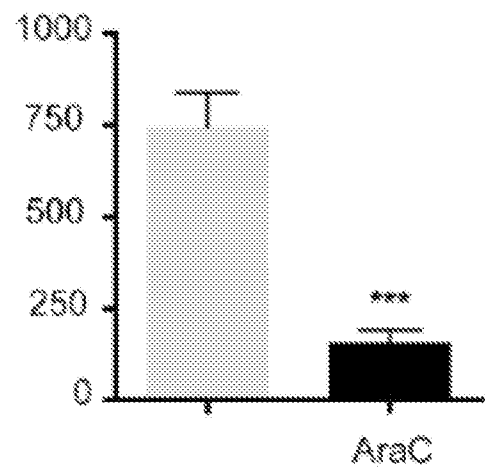


Figure 52

29/29

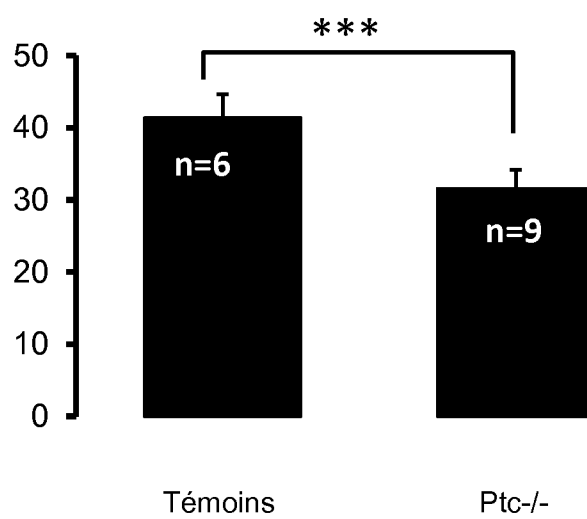


Figure 53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/050981

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01K67/027 C07K14/705
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A01K C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99/61582 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; UNIV CALIFORNIA [US]) 2 December 1999 (1999-12-02) page 7, line 24 - line 36 page 8, line 26 - line 30 page 9, line 12 - line 20 examples 1, 2 ----- -/--	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 August 2015

Date of mailing of the international search report

10/08/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rojo Romeo, Elena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/050981

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ELISABETH TRAIFFORT ET AL: "Regional Distribution of Sonic Hedgehog, Patched, and Smoothed mRNA in the Adult Rat Brain", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 70, no. 3, 1 March 1998 (1998-03-01), pages 1327-1330, XP055137279, ISSN: 0022-3042, DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.70031327.x page 1329, paragraph 2 Discussion, alinéa 3 -----	1-9
Y	ELISABETH TRAIFFORT ET AL: "Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system", EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 11, no. 9, 1 September 1999 (1999-09-01), pages 3199-3214, XP055137274, ISSN: 0953-816X, DOI: 10.1046/j.1460-9568.1999.00777.x Discussion -----	1-9
Y	L. V. GOODRICH: "Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse patched Mutants", SCIENCE, vol. 277, no. 5329, 22 August 1997 (1997-08-22), pages 1109-1113, XP055137240, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.277.5329.1109 the whole document -----	1-9
Y	WARD RYAN J ET AL: "Multipotent CD15(+) Cancer Stem Cells in Patched-1-Deficient Mouse Medulloblastoma", CANCER RESEARCH, vol. 69, no. 11, June 2009 (2009-06), pages 4682-4690, XP002729159, ISSN: 0008-5472 the whole document ----- -/--	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2015/050981

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTIAL RUAT ET AL: "Sonic Hedgehog, un morphogène en quête de fonction dans le cerveau adulte", MÉDECINE/SCIENCES, vol. 27, no. 11, 1 November 2011 (2011-11-01), pages 979-985, XP055137288, ISSN: 0767-0974, DOI: 10.1051/medsci/20112711014 abstract "Signalisation Shh dans les zones de neurogenèse et contrôle des propriétés des précurseurs neuraux adultes"; page 981 - page 982 "Voie Hedgehog et autres pathologies cérébrales"; page 984 -----	1-9
Y	J. FERENT ET AL: "Sonic Hedgehog Signaling Is a Positive Oligodendrocyte Regulator during Demyelination", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 33, no. 5, 30 January 2013 (2013-01-30), pages 1759-1772, XP055137297, ISSN: 0270-6474, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3334-12.2013 page S97, paragraph 2 page S100, paragraph 1 -----	1-9
Y	TETSUJI MORI ET AL: "Inducible gene deletion in astroglia and radial glia-A valuable tool for functional and lineage analysis", GLIA, vol. 54, no. 1, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 21-34, XP055137644, ISSN: 0894-1491, DOI: 10.1002/glia.20350 abstract page 21, left-hand column, paragraph 2 page 22, left-hand column, paragraph 2 Discussion, en particulier, premiers deux alinéas, alinéa entre les pages 30 and 31 and pages 31-32 "Potential applications of GLAST::CreERT2 mediated gene deletion in the adult brain". -----	1-9
Y	SONIA BONILLA ET AL: "Identification of midbrain floor plate radial glia-like cells as dopaminergic progenitors", GLIA, vol. 56, no. 8, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 809-820, XP055137652, ISSN: 0894-1491, DOI: 10.1002/glia.20654 abstract -----	1-9
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2015/050981

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARTA BOCCAZZI ET AL: "Purines regulate adult brain subventricular zone cell functions: Contribution of reactive astrocytes", GLIA, vol. 62, no. 3, 31 December 2013 (2013-12-31), pages 428-439, XP055137656, ISSN: 0894-1491, DOI: 10.1002/glia.22614 abstract -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2015/050981

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9961582	A2	02-12-1999	
		AU 4321599 A	13-12-1999
		EP 1124723 A1	22-08-2001
		JP 2002516788 A	11-06-2002
		WO 9961582 A2	02-12-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/050981

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A01K67/027 C07K14/705 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A01K C12N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 99/61582 A2 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]; UNIV CALIFORNIA [US]) 2 décembre 1999 (1999-12-02) page 7, ligne 24 - ligne 36 page 8, ligne 26 - ligne 30 page 9, ligne 12 - ligne 20 exemples 1, 2 ----- -/--	1-9
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
3 août 2015		10/08/2015
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Rojo Romeo, Elena

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/050981

Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.c de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, la recherche internationale a été effectuée sur la base d'un listage des séquences :
- a. ☒ faisant partie de la demande internationale telle que déposée :
- ☒ sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.
- ☐ sur papier ou sous forme d'un fichier image.
- b. ☐ remis avec la demande internationale, exclusivement aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13~~ter~~.1.a), sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25.
- c. ☐ remis postérieurement à la date de dépôt international exclusivement aux fins de la recherche internationale :
- ☐ sous forme d'un fichier texte selon la norme de l'annexe C/ST.25 (règle 13~~ter~~.1.a)).
- ☐ sur papier ou sous forme d'un fichier image (règle 13~~ter~~.1.b) et instruction administrative 713).
2. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences a été déposée ou remise, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles faisant partie de la demande telle que déposée et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	ELISABETH TRAIFFORT ET AL: "Regional Distribution of Sonic Hedgehog, Patched, and Smoothed mRNA in the Adult Rat Brain", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, vol. 70, no. 3, 1 mars 1998 (1998-03-01), pages 1327-1330, XP055137279, ISSN: 0022-3042, DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.70031327.x page 1329, alinéa 2 Discussion, alinéa 3 -----	1-9
Y	ELISABETH TRAIFFORT ET AL: "Discrete localizations of hedgehog signalling components in the developing and adult rat nervous system", EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 11, no. 9, 1 septembre 1999 (1999-09-01), pages 3199-3214, XP055137274, ISSN: 0953-816X, DOI: 10.1046/j.1460-9568.1999.00777.x Discussion -----	1-9
Y	L. V. GOODRICH: "Altered Neural Cell Fates and Medulloblastoma in Mouse patched Mutants", SCIENCE, vol. 277, no. 5329, 22 août 1997 (1997-08-22), pages 1109-1113, XP055137240, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.277.5329.1109 le document en entier -----	1-9
Y	WARD RYAN J ET AL: "Multipotent CD15(+) Cancer Stem Cells in Patched-1-Deficient Mouse Medulloblastoma", CANCER RESEARCH, vol. 69, no. 11, juin 2009 (2009-06), pages 4682-4690, XP002729159, ISSN: 0008-5472 le document en entier ----- -/--	1-9

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MARTIAL RUAT ET AL: "Sonic Hedgehog, un morphogène en quête de fonction dans le cerveau adulte", MÉDECINE/SCIENCES, vol. 27, no. 11, 1 novembre 2011 (2011-11-01), pages 979-985, XP055137288, ISSN: 0767-0974, DOI: 10.1051/medsci/20112711014 abrégé "Signalisation Shh dans les zones de neurogenèse et contrôle des propriétés des précurseurs neuraux adultes"; page 981 - page 982 "Voie Hedgehog et autres pathologies cérébrales"; page 984 -----	1-9
Y	J. FERENT ET AL: "Sonic Hedgehog Signaling Is a Positive Oligodendrocyte Regulator during Demyelination", JOURNAL OF NEUROSCIENCE, vol. 33, no. 5, 30 janvier 2013 (2013-01-30), pages 1759-1772, XP055137297, ISSN: 0270-6474, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3334-12.2013 page S97, alinéa 2 page S100, alinéa 1 -----	1-9
Y	TETSUJI MORI ET AL: "Inducible gene deletion in astroglia and radial glia-A valuable tool for functional and lineage analysis", GLIA, vol. 54, no. 1, 1 juillet 2006 (2006-07-01), pages 21-34, XP055137644, ISSN: 0894-1491, DOI: 10.1002/glia.20350 abrégé page 21, colonne de gauche, alinéa 2 page 22, colonne de gauche, alinéa 2 Discussion, en particulier, premiers deux alinéas, alinéa entre les pages 30 and 31 and pages 31-32 "Potential applications of GLAST::CreERT2 mediated gene deletion in the adult brain". ----- -/--	1-9

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	SONIA BONILLA ET AL: "Identification of midbrain floor plate radial glia-like cells as dopaminergic progenitors", GLIA, vol. 56, no. 8, 1 juin 2008 (2008-06-01), pages 809-820, XP055137652, ISSN: 0894-1491, DOI: 10.1002/glia.20654 abrégé -----	1-9
Y	MARTA BOCCAZZI ET AL: "Purines regulate adult brain subventricular zone cell functions: Contribution of reactive astrocytes", GLIA, vol. 62, no. 3, 31 décembre 2013 (2013-12-31), pages 428-439, XP055137656, ISSN: 0894-1491, DOI: 10.1002/glia.22614 abrégé -----	1-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2015/050981

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9961582	A2	02-12-1999	
		AU 4321599 A	13-12-1999
		EP 1124723 A1	22-08-2001
		JP 2002516788 A	11-06-2002
		WO 9961582 A2	02-12-1999
