UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : Santé, Sciences, Technologie

<u>Équipes</u> :

Contrôle central de l'ovulation, INRA, Nouzilly

Neurogénèse, aromatase et oestradiol, UMR 6026, Université Rennes1

THÈSE présentée par :

Karen MOURIEC

Soutenue le : **23 octobre 2008**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

Régulation de l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires dans le cerveau du poisson zèbre (*Danio rerio*) et rôles potentiels dans la neurogénèse adulte.

THÈSE dirigée par :

Mme Anne DUITTOZ	Professeur, Université François – Rabelais, Tours
Mr Olivier KAH	Directeur de recherche CNRS, Rennes I

RAPPORTEURS :

Mr Serge CARREAU	Directeur de recherche CNRS, Caen
Mr Jean Stéphane JOLY	Directeur de recherche INRA, Gif-sur-Yvette

---

JURY :

Mr André CALAS	Professeur émérite, Université de Bordeaux II
Mr Serge CARREAU	Directeur de recherche CNRS, Caen
Mme Anne DUITTOZ	Professeur, Université François – Rabelais, Tours
Mr Jean Stéphane JOLY	Directeur de recherche INRA, Gif-sur-Yvette
Mr Olivier KAH	Directeur de recherche CNRS, Rennes I
Mr Gustavo SOMOZA	Directeur de recherche CONICET, Chascomus, Argentine
Mr Yves TILLET	Directeur de recherche INRA, Nouzilly, Tours

UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS

DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : Santé, Sciences, Technologie

<u>Équipes</u> :

Contrôle central de l'ovulation, INRA, Nouzilly

Neurogénèse, aromatase et oestradiol, UMR 6026, Université Rennes1

THÈSE présentée par :

Karen MOURIEC

Soutenue le : **23 octobre 2008**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

Régulation de l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires dans le cerveau du poisson zèbre (*Danio rerio*) et rôles potentiels dans la neurogénèse adulte.

THÈSE dirigée par :

Mme Anne DUITTOZ	Professeur, Université François – Rabelais, Tours
Mr Olivier KAH	Directeur de recherche CNRS, Rennes I

RAPPORTEURS :

Mr Serge CARREAU	Directeur de recherche CNRS, Caen
Mr Jean Stéphane JOLY	Directeur de recherche INRA, Gif-sur-Yvette

---

JURY :

Mr André CALAS	Professeur émérite, Université de Bordeaux II
Mr Serge CARREAU	Directeur de recherche CNRS, Caen
Mme Anne DUITTOZ	Professeur, Université François – Rabelais, Tours
Mr Jean Stéphane JOLY	Directeur de recherche INRA, Gif-sur-Yvette
Mr Olivier KAH	Directeur de recherche CNRS, Rennes I
Mr Gustavo SOMOZA	Directeur de recherche CONICET, Chascomus, Argentine
Mr Yves TILLET	Directeur de recherche INRA, Nouzilly, Tours

A ma famille,
Je n'oublie jamais d'où je viens…

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les Docteurs Jean-Stéphane Joly et Serge Carreau d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteurs, ainsi que Yves Tillet, Gustavo Somoza et André Calas d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je remercie mon directeur de thèse, Olivier Kah pour ses conseils avisés, sa franchise, de m'avoir permis d'acquérir mon autonomie scientifique et d'améliorer mon anglais. Je remercie également Anne Duittoz, ma co-directrice de thèse, de m'avoir fait découvrir l'INRA de Nouzilly et pour son optimisme. Et de m'avoir laissé ma chance en Master 2, j'en profite donc pour remercier les membres du jury JL et F Dacheux, Y. Combarnous, D. Monniaux et D. Royère : c'est grâce à vous que l'aventure poisson zèbre a commencé !!!
Elisabeth Pellegrini : la « cocotte » te remercie pour ton aide, ta gentillesse et ta pédagogie. Je remercie également Isabelle Anglade : Isabelle, penses-tu que l'embryon soit devenu une larve ? Merci pour tes conseils, ton humour noir…j'adore.
Je remercie également pour nos discussions ML Thieulant, C.Vaillant et N. Diotel, autres membres de l'équipe NAO.
Ainsi que Mado, que dire… MERCI, tu as été un ange dans la tourmente de la thèse…

Je remercie ensuite tous les membres de l'équipe RED, en particulier Farzad : je ne sais comment te remercier pour tes conseils et ta considération scientifiques mais également ton soutien, tu m'as aidée plus que tu ne le croies. Toi aussi Gilles, un grand merci pour ton aide et ton soutien.
Merci à Guillaume, pour ton aide et d'avoir partagé ma condition de thésard…Merci à Antoine : je sais, je suis une râleuse et Denis : je sais je te donne mal à la tête avec mon aromatase en anglais…
Milène, merci pour ton aide technique, ton soutien précieux et surtout n'oublie pas la goutte !!! Christelle, pfff veux tu m'adopter ???

J'adresse des remerciements chaleureux aux membres de l'équipe SPARTE, en particulier Raphaël, merci beaucoup pour tes conseils scientifiques et ton humanité.
Christine merci beaucoup, entre blondes bretonnes on se comprend… Merci Mini Miss Mayenne, notre connexion était parfaite tu te reconnaîtras…

Je remercie également les membres de HIP, en particulier Catherine, Christophe merci beaucoup et pardon pour mes oublis …Je pense également à Fabienne… et un merci particulier à Philippe, dans ce monde où l'individualisme prime sur tout autre chose ; toi tu existes, surtout reste comme tu es…

Je remercie également Brigitte, Gaëlle, Cyril ainsi que Fabrice pour son aide mais également sa bonne humeur.

Isabelle, alors tu m'as inscrite ?? Une pensée particulière pour Séverine…Merci également à Chantal, Patricia et Emmanuelle pour votre gentillesse…

Ah j'allais t'oublier Frédéric, tes chansons et ta bonne humeur sont une vraie bouffée d'oxygène en salle de culture…

Enfin à tous les autres : Mélanie, Arianna, Cynthia, François, Yoann, Yann, Arnaud…des remerciements particuliers à Christèle, merci d'avoir été là…

A ma famille,

Papa, j'y croyais plus, tu l'as fait…aucun mot n'est assez fort pour exprimer ce que je ressens... Alors je dirai un père a deux vies, la sienne et celle de son enfant ; et à cela j'ajouterai une troisième, celle de ses petits-enfants…

Maman, les études c'est bien mais ça ne remplace en rien les valeurs que tu m'as transmises, ne t'inquiète pas, je n'oublie pas d'où je viens ni qui je suis…

Mon frère, qui plus que toi crois en moi…Ma sœur, comment te remercier,… Vous avez tant fait …Et vous êtes toujours là…pour votre « petite » sœur.

A Fan et Fred…

A mes nièces, Awena, Katell et Alyssa, MERCI d'avoir enchanté ma thèse et d'avoir changé nos vies…

Aurore, il est des personnes qui croisent votre chemin et qu'on n'oublie jamais…

Des mercis particuliers à Christine, Mary, Mickael, Pascal, Nicolas, merci d'avoir été là…

Enfin pour terminer, un clin d'œil à toutes les personnes et événements qui ont croisé ma route et qui ont tenté de me décourager, vous m'avez aidée plus que vous ne le pensez, pour ça, je vous remercie…

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Publications

Pellegrini E*, **Mouriec K***, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdal F and Kah O. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. J Comp Neurol. 2007 Mar 1;501(1):150-67. *These authors contributed equally to this work.

Mouriec K, Pellegrini E, Anglade I, Menuet A, Adrio F, Thieulant ML, Pakdel F, Kah O. Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: Evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis ? Brain Res Bull. 2008 Mar 18;75 (2-4): 274-80.

Tong SK, **Mouriec K**, Kuo MW, Pellegrini E, Gueguen MM, Brion F, Kah O, Chung BC. A cyp19a1b-GFP (Aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. Genesis, In press.

Mouriec K, Lethimonier C, Lareyre JJ, Pellegrini E, Pakdel F, Kah O, Anglade I. Spatiotemporal relationship between *cyp19a1b* (aromatase B) and estrogen-receptor expression in the brain of developing zebrafish. En préparation.

Mouriec K, Gueguen MM, Manuel C, Percevault F, Thieulant ML, Pakdel F, Kah O. Androgens upregulate *cyp19a1b* (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors. Biology of Reproduction, accepted for publication.

Communications orales

Mouriec K: Expression et régulation de l'aromatase dans le cerveau de poisson zèbre : rôles potentiels dans la neurogénèse. 11th PhD student meeting of the UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements de l'INRA de Nouzilly (Tours). Juin 2006.

Mouriec K : Aromatase-positive radial glial cells are progenitor cells in the brain of adult zebrafish. 10 ème Journée LARC-Neurosciences, Lille. Novembre 2006. En anglais.

Mouriec K : Aromatase-positive radial glial cells are progenitor cells in the brain of adult zebrafish. « 8th International Congress on Reproductive Fish Physiology » à St-Malo. Juin 2007. En anglais.

Mouriec K: Neurogénèse chez le poisson : intérêt d'un modèle de poisson zèbre transgénique *cyp19a1b*-GFP. « 13th PhD student meeting » de l'UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements de l'INRA de Nouzilly (Tours). Juin 2008.

Mouriec K, Tong SK, Pellegrini E, Gueguen MM, Brion F, Chung BC et Kah O (2008). Expression de l'aromatase dans les cellules progénitrices du cerveau : invention des poissons ou exagération d'un mécanisme discret chez les autres Vertébrés ? 35ème colloque de la Société de Neuroendocrinologie, 10-12 septembre 2008, Strasbourg, France. **(Prix Servier).**

Communications affichées

Mouriec K, Anglade I, Pellegrini E, Gueguen MM, Lareyre JJ, Pakdel F, Kah O (2007). Emergence de la signalisation œstrogénique dans le cerveau du poisson zèbre. 34ème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, 25 -27 septembre 2007, Tours, France.

Mouriec K, Anglade I, Pellegrini E, Gueguen MM, Lareyre JJ, Pakdel F, Kah O (2007) Emergence of an estrogenic regulation in the developing brain of zebrafish. 11ème Journée LARC-Neurosciences, 12 octobre 2007, Rennes, France.

Mouriec K, Senger F, Pellegrini E, Tong SK, Chung BC, Kah O (2007). Apport de la microscopie multiphotonique pour l'étude des processus de neurogénèse sur un modèle de zebrafish transgénique. 1ère Journée interface Biologie, Chimie, Physique de l'Université de Rennes 1, France. **(Prix du poster)**.

Pellegrini E, **Mouriec K**, Menuet A, Anglade I, Brion F, Pakdel F, Kah O (2006). How adult fish grow their brains? A functional link between neurogenesis and aromatase activity in zebrafish. « 23rd Conference of European Comparative Endocrinologists », 29 août-2 septembre, Manchester, UK.

Anglade I, **Mouriec K**, Pellegrini E, Lethimonier C, Lareyre JJ, Pakdel F, Kah O (2007). Emergence of estrogen signalling in the brain of zebrafish embryos and larvae. « 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish », 3 au 8 juin 2007, Saint-Malo, France.

Tong, SK, **Mouriec K**, Kah O, Chung BC (2007). Generation of Cyp19b: GFP transgenic line in zebrafish, *Danio rerio*. 5th European Zebrafish Genetics and Developmental Meeting, 12 au 15 juillet 2007, Amsterdam.

Tong SK, **Mouriec K**, Pellegrini E, Chung BC, Kah O (2007). Characterization of a transgenic zebrafish line expressing GFP in aromatase B-positive and BLBP positive radial glial progenitor cells. 34ème colloque de la Société de Neuroendocrinologie, 25 au 27 septembre 2007, Tours, France.

Diotel N, **Mouriec K**, Gueguen MM, Kah O, Vaillant C (2007). Caractérisation de cellules progénitrices Aromatase B-positives et BLBP-positives dans le cerveau du poisson zèbre adulte. 34ème colloque de la Société de Neuroendocrinologie, 25-27 septembre 2007, Tours, France.

Séminaire

Mouriec K: Aromatase: expression, regulation and potential role in neurogenesis in the brain of zebrafish. Séminaire à l'institut de biologie moléculaire, Academia Sinica, Taipei, Taiwan. En anglais.

RESUME

L'œstradiol (E2) est une hormone pléïotropique intervenant dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques notamment au niveau du système nerveux central. En particulier, l'E2 module des processus cellulaires impliqués dans la neurogénèse, pendant le développement embryonnaire, chez l'adulte et également en cas de réparation neuronale. Contrairement aux mammifères, chez lesquels la neurogénèse adulte est limitée, les poissons téléostéens présentent une intense neurogénèse adulte dans tout le cerveau. De plus, ces poissons présentent plusieurs spécificités fonctionnelles concernant l'aromatase, l'enzyme de synthèse de l'E2. En effet, l'aromatase cérébrale (aromatase B) est régulée positivement par l'E2, et est très fortement exprimée dans les cellules gliales radiaires, dont le rôle est inconnu chez les poissons, mais qui sont connues pour être des cellules progénitrices neuronales chez les mammifères lors de la neurogénèse embryonnaire. Au vu de ces données, l'objectif de ce travail était d'examiner l'hypothèse que l'E2 puisse être impliqué dans le maintien et la forte activité neurogénique chez les poissons téléostéens.

Nous avons ainsi, tout d'abord montré que les cellules gliales radiaires présentes dans le cerveau adulte de poisson zèbre (*Danio rerio*), un poisson téléostéen, sont des cellules progénitrices neuronales. De plus, nous avons caractérisé et validé une lignée de poisson zèbre transgénique aromatase B/GFP en montrant que la GFP (placée sous le contrôle du promoteur du gène aromatase) est coexprimée avec l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires chez les larves et les adultes. De plus, l'expression de ce transgène est stimulée par l'E2. Nous avons ensuite approfondi l'étude des mécanismes de régulation de l'expression du gène codant l'aromatase B. Nous avons ainsi mis en évidence que des androgènes aromatisables, comme la testostérone, ou non aromatisables, comme la dihydrotestostérone et un de ces métabolites, la βdiol peuvent réguler l'aromatase B, et ceci *via* les récepteurs aux œstrogènes (ERs) et non les récepteurs aux androgènes. Nous avons également démontré que les ARNm codant les ERs et l'aromatase B apparaissent très tôt pendant le développement du poisson zèbre et augmentent fortement entre 24h et 48h. L'utilisation d'un antagoniste des ERs nous a permis de conclure que la signalisation œstrogénique se met en place entre 24h et 48h.

Ces travaux mettent donc en avant l'existence d'un lien potentiel entre l'E2 et la forte activité neurogénique présente chez les poissons, constituant un processus qui pourrait être une caractéristique évolutive ou une exagération de mécanismes observés chez les mammifères.

Mots clé : aromatase B, *cyp19a1b*, œstradiol, androgènes, récepteurs aux œstrogènes, neurogénèse, cellules gliales radiaires, poisson zèbre, téléostéen.

ABSTRACT

Estradiol (E2) is a pleiotropic hormone involved in many physiological and physiopathological processes notably within the central nervous system. Indeed, E2 can modulate cell processes implicated in neurogenesis, either during embryonic development and adulthood or in the case of brain repair. In contrast to mammals, in which adult neurogenesis is limited, neoneurogenesis in fish is very active in the whole brain. In addition to this active neurogenesis, fish are well known for strongly expressing aromatase B, the enzyme that synthesizes E2 within the radial glial cells. The role of such cells is unknown in fish but they are progenitor cells during embryonic neurogenesis in mammals. The purpose of this work was to explore the hypothesis that aromatase expressing radial glial cells are progenitor cells in adult fish and to further investigate the mechanisms mediating aromatase expression in these cells.

Using a combination of BrdU treatment and immunohistochemistry, we show that indeed, radial glial cells are progenitor cells in the adult brain of zebrafish (*Danio rerio*). Moreover, we characterize and validate a transgenic zebrafish line aromatase B/GFP by showing that GFP (under the control of the promoter of aromatase B gene) is coexpressed with aromatase B and BLBP in the radial glial cells in larvae and adults. We also show that transgene expression is up-regulated by E2. We further investigate the mechanisms underlying the regulation of the aromatase B gene by sex steroids. We highlight that, similar to estrogens, aromatizable androgens (testosterone) and certain non aromatizable androgens (dihydrotestosterone), can induce aromatase B only in radial glial cells. However, our data show this regulation is mediated through estrogen receptors after aromatization of testosterone or conversion of DHT into an estrogenic βdiol compound. We also evidence that estrogen receptors messengers increase in parallel with those of aromatase B during early development and that blocking estrogen receptors causes a strong reduction in aromatase B expression. All these data point to a strong link between steroid levels and aromatase B expression.

In conclusion, this work further documents the regulation and expression of aromatase B within the radial glial cells and suggests a strong link between E2 expression in these cells and the strong neurogenic activity observed in adult fish. These mechanisms could either represent an adaptative feature of fish or an exaggeration of similar but more subtle mechanisms existing in other vertebrates.

Key words: aromatase B, estradiol, estrogen receptors, radial glial cells, neurogenesis, zebrafish.

ABREVIATIONS

3β-HSD	3β-hydroxystéroïde déshydrogénase
17β-HSD	17β-hydroxystéroïde déshydrogénase
AF	fonction de transactivation
AP1	« activating protein 1 »
AR	récepteurs aux androgènes
ArKO	KO du gène *aromatase*
AVPV	zone périventriculaire antéroventrale
BLBP	« brain lipid-binding protein »
BrdU	2-déoxy-bromo-uridine
Cyp	Cytochrome P450
DHA	déhydroépiandrostérone
DHT	dihydrotestostérone
E2	œstradiol
EGF	« epidermal growth factor »
ER	récepteur aux œstrogènes
ERαKO	KO du gène *ERα*
ERβKO	KO du gène *ERβ*
ERE	élément de réponse aux œstrogènes
GFAP	« glial fibrillary acidic protein »
GFP	« green fluorescent protein »
GLAST	transporteur au L-glutamate et L-aspartate
GPR30	« G-protein coupled receptor 30 »
GS	glutamine synthase
GxRE	élément de réponse au facteur glial x
HVC	« high vocal center »
KO	« knock-out »
NSC	cellules souches neurales
PCR	« polymerase chain reaction »
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
POA	aire préoptique
RMS	« rostral migratory stream »
RT-PCR	« reverse transcriptase – polymerase chain reaction »
sGTHII β	« salmon gonadotropin hormone II beta »
SGZ	zone sous granulaire
SNC	système nerveux central
SVZ	zone sous ventriculaire
T	testostérone
TK	thymidine kinase
VZ	zone ventriculaire
zfER	récepteur aux œstrogènes de poisson zèbre

Sommaire

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS 1

INTRODUCTION 3

I- L'ŒSTRADIOL 3

I-1 SYNTHESE 3

I-2 MODES D'ACTION DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES (ER) 4

I-2.1 Historique/Généralités 4

I-2.2 Actions génomiques et non génomiques 6

I-2.2.1 Actions génomiques 6

I-2.2.1a La voie génomique directe 6

I-2.2.1b La voie génomique indirecte 7

I-2.2.2 Actions non génomiques (membranaires) 7

I-2.3 Trois ERs chez les poissons 8

I-2.3.1 Caractéristiques 8

I-2.3.2 Différences fonctionnelles 9

I-2.3.3 Effets génomiques et non génomiques 9

I-3 L'AROMATASE, UNIQUE ENZYME DE SYNTHESE DE L'E2 10

I-3.1 Généralités 10

I-3.2 Activité enzymatique 11

I-3.3 Une duplication du gène aromatase chez les poissons 12

I-3.4 Distribution cérébrale de l'aromatase 12

I-3.4.1 Distribution de l'aromatase chez les mammifères et oiseaux 13

I-3.4.2 Distribution de l'aromatase chez les poissons 13

I-3.5 Régulation de l'aromatase par les stéroïdes sexuels: androgènes et œstrogènes 14

I-3.6 Rôles de l'aromatase au niveau central 17

I-3.6.1 Différenciation sexuelle 17

I-3.6.2 Comportement sexuel 17

I-3.6.3 Réparation neuronale 18

I-3.6.4 Neuroprotection 18

I-3.7 Synthèse des neurostéroïdes 19

I-4 E2, ERs et Systeme nerveux central 21

I-4.1 Généralités 21

I.4.2 Distributions des ERs dans le cerveau des mammifères 21

I-4.3 Distributions des ERs dans le cerveau des poissons 22

I-4.4 Données des knock-out des ERs chez la souris 23

II- NEUROGENESE 24

II-1 Generalites 24

II-2 Les cellules gliales radiaires 25

II-2.1 Historique 25

II-2.2 Définition et caractéristiques 25

II-2.3 Marqueurs de cellules gliales radiaires 26

II-2.3.1 Chez les mammifères 26

II-2.3.2 Chez les poissons 27

II-2.3.3 L'aromatase, un marqueur inattendu des cellules gliales radiaires 28

II-3 Roles des cellules gliales radiaires 28

II-3.1 Support de migration pour les neurones 28

II-3.2 Cellules progénitrices neuronales 29

II-3.2.1 Pendant le développement embryonnaire 29

II-3.2.2 Neurogénèse adulte 31

II-3.2.2a Neurogénèse adulte chez les mammifères 32

II-3.2.2a1 La zone sous-ventriculaire (SVZ) 32

II-3.2.2a2 La zone sous-granulaire (SGZ) 33

II-3.2.2b Neurogénèse adulte chez les oiseaux 34

II-3.2.2c Neurogénèse adulte chez les poissons 35

III- ŒSTRADIOL ET NEUROGENESE 36

III-1 CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES 37

III-1.1 Développement 37

III-1.2 Adulte 37

III-2 REPARATION NEURONALE 38

OBJECTIFS DE LA THESE 40

RESULTATS 42

Chapitre 1. Aromatase B, cellules gliales radiaires et neurogénèse 42

I-1 Identification of aromatase-positive radial glial cell as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish

Elisabeth Pellegrini*, Karen Mouriec*, Isabelle Anglade, Arnaud Menuet, Yann Le Page, Marie-Madeleine Gueguen, Marie-Hélène Marmignon, François Brion,Farzad Pakdel, Olivier Kah. * These authors contributed equally to this work.
J COMP NEUROL. 2007 Mar 1; 501(1) : 150-67 42

I-2 A *cyp19a1b*-GFP (Aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells

Sok-Keng Tong, Karen Mouriec, Ming-wei Kuo, Elisabeth Pellegrini, Marie-Madeleine Gueguen, François Brion, Olivier Kah, Bon-chu Chung.
GENESIS, In press **60**

Chapitre 2. Expression et régulation de l'aromatase B par les stéroïdes .. 67

II-1 Spatiotemporal relationship between *cyp19a1b* (aromatase B) and estrogen-receptor expression in the brain of developing zebrafish

Karen Mouriec, Christèle Lethimonier, Jean-Jacques Lareyre, Elisabeth Pellegrini, Farzad Pakdel, Olivier Kah, Isabelle Anglade **67**

II-2 Androgens upregulate *cyp19a1b* (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors

Karen Mouriec, Marie-Madeleine Gueguen, Christelle Manuel, Frédéric Percevault, Marie-Lise Thieulant, Farzad Pakdel, Olivier Kah

Biology of Reproduction, Accepted for publication **85**

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 109

I. Les cellules gliales radiaires sont des cellules progénitrices dans le cerveau adulte de poisson zèbre. **110**

I.1 Division symétrique ou asymétrique ? **111**

I.2 Nature et rôle des cellules BrdU positives/aromatase B négatives ? **113**

I.3 Persistance des cellules gliales radiaires chez les poissons adultes : la clé de l'intense neurogenèse chez les poissons ? **114**

I.4 Et les astrocytes ? **114**

II. Pourquoi une telle sensibilité de l'aromatase B à l'E2 dans le cerveau des poissons ? **115**

II.1 La combinaison des régulations œstrogéniques et androgéniques de l'aromatase B est-elle seule responsable de la forte expression de l'aromatase ? **116**

II.2 Y a-t-il une synthèse complète des stéroïdes dans les cellules gliales radiaires ? **117**

III. Y a t-il un lien entre aromatase, E2 et neurogenèse chez les poissons et ce lien pourrait-il être responsable du maintien et de la forte activité neurogénique chez les poissons ? **118**

III.1 Aromatase, œstradiol et neurogenèse **118**

III.2 Régulation de l'aromatase dans les astrocytes après lésion chez les mammifères et oiseaux ? **126**

III.3 Aromatase et « sexualisation » du cerveau **126**

IV. Conclusion générale **129**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **130**

Avant-propos

AVANT-PROPOS

L'œstradiol (E2) est une hormone stéroïdienne qui exerce des effets pléiotropes. Elle intervient dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques sur différents tissus cibles dont le cerveau. Au niveau du système nerveux central (SNC), les effets de l'E2 sur la régulation de l'axe gonadotrope ont été particulièrement étudiés. Cependant, l'E2 exercerait également des rôles sur l'organisation, la plasticité et le fonctionnement du SNC. Récemment, ces études se sont intensifiées en raison des rôles potentiels de l'E2, d'une part dans l'étiologie des maladies neurodégénératives et, d'autre part, dans la modulation de l'activité neurogénique embryonnaire ou adulte.

Dans ce contexte, les poissons téléostéens présentent des caractéristiques qui les rendent particulièrement intéressants. D'une part, contrairement aux autres vertébrés, les poissons présentent une intense activité neurogénique tout au long de leur vie, suggérant des mécanismes particuliers dans le maintien et la prolifération de progéniteurs neuronaux chez l'adulte. D'autre part, l'aromatase, l'enzyme de synthèse de l'E2, possède chez les poissons des caractéristiques intrigantes, notamment, une très forte expression dans les cellules gliales radiaires et une régulation positive du gène codant l'aromatase par l'E2. Cependant, jusqu'à présent, aucune corrélation n'a été établie entre cette forte activité neurogénique et l'importante capacité du cerveau de ces poissons à produire de l'E2.

Face à ces données, il est donc intéressant d'étudier les processus de la neurogénèse adulte et la modulation potentielle de ces processus par l'E2, afin de mieux comprendre les mécanismes propres aux poissons téléostéens, mais également, d'une manière générale, pour tenter de répondre à une question : la neurogénèse observée chez les poissons adultes résulte-t-elle de caractéristiques évolutives ou est-elle une exagération de processus existants, mais plus discrets, chez les autres vertébrés notamment les mammifères ? Dans ce dernier cas de figure, les poissons téléostéens se présenteraient donc comme de très bons modèles d'étude pour la compréhension des mécanismes impliquant l'E2 dans la neurogénèse.

Les objectifs de ce travail étaient donc d'aborder l'étude des processus de neurogénèse chez les poissons téléostéens adultes et, en particulier, d'identifier les cellules impliquées dans le maintien de cette forte activité neurogénique. De plus, l'aromatase, présentant de nombreuses caractéristiques spécifiques à cette branche évolutive, un autre objectif de cette thèse était d'approfondir l'étude de l'expression et de la régulation de cette protéine.

Compte tenu de nos objectifs, l'introduction générale de ce manuscrit abordera, dans un premier temps, les données bibliographiques concernant les rôles principaux de l'E2, ainsi que ses modes d'actions, en se focalisant uniquement sur le SNC. Dans un second temps, nous rappellerons les principales données existant sur la neurogénèse embryonnaire et adulte chez les vertébrés. Puis, nous terminerons en présentant les liens possibles entre la neurogénèse et le rôle potentiel de l'E2 dans ces processus.

Introduction générale

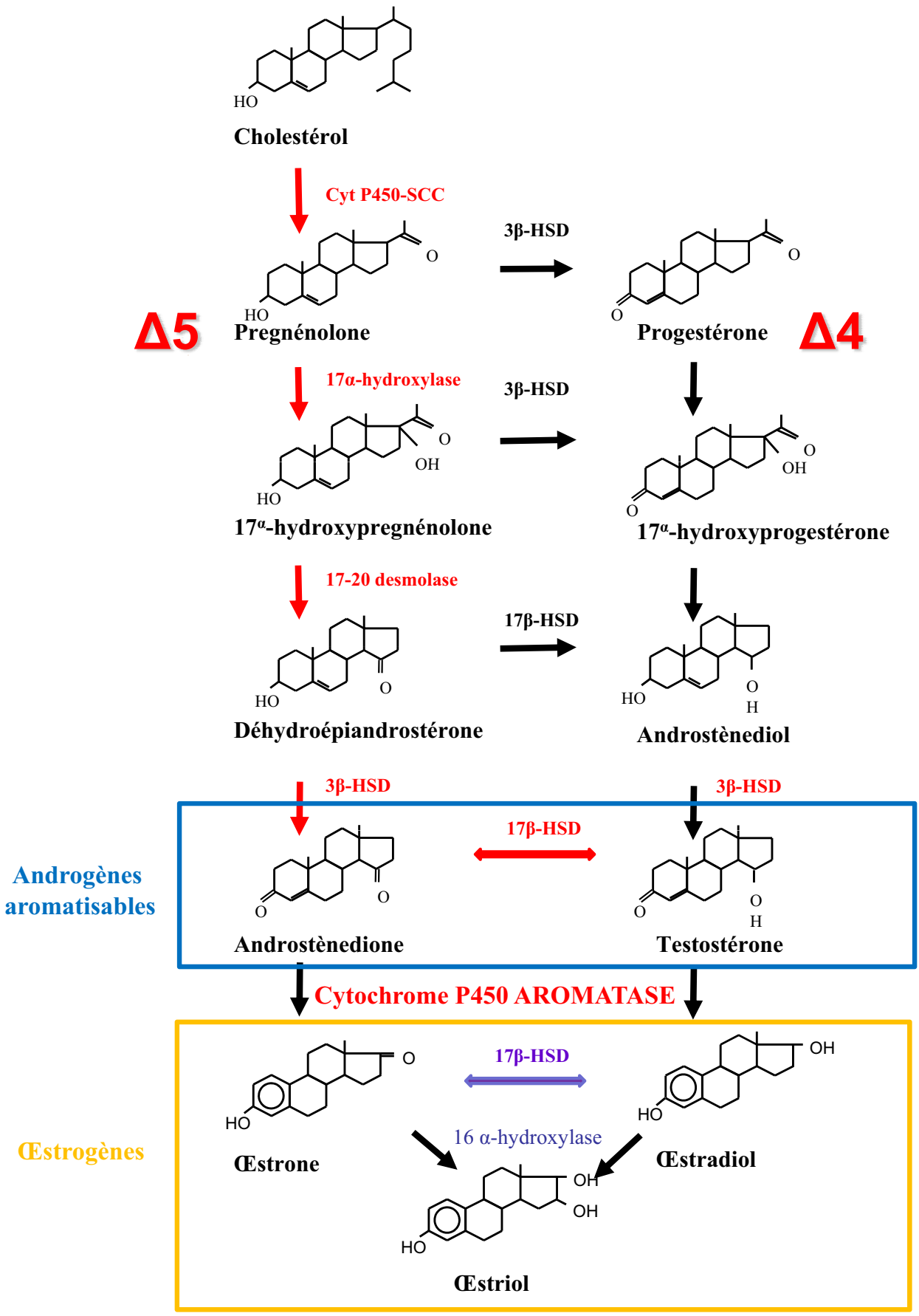


Figure 1 : **Biosynthèse des stéroïdes sexuels.** Les flèches rouges indiquent la voie préférentielle de la stéroïdogenèse. *Abréviation* : Cyt P450scc : enzyme de clivage de la chaine latérale du cholestérol; 3βHSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase/delta5-delta4 isomérase); 17βHSD : 17β-hydroxystéroïde déhydrogénase.

INTRODUCTION

I- L'ŒSTRADIOL

I-1 SYNTHESE

L'œstradiol (E2) est une hormone stéroïdienne classiquement considérée comme « femelle » appartenant au sous-groupe des œstrogènes qui comprend également l'œstrone et l'œstriol. Les œstrogènes sont synthétisés à partir du cholestérol sous l'action des enzymes de la stéroïdogénèse (**Figure 1**). Au niveau cellulaire, la synthèse d'E2 est initiée au niveau de la mitochondrie par conversion du cholestérol en prégnénolone grâce au complexe enzymatique cytochrome P450-scc (« side-chain cleavage »), qui est présent uniquement dans la membrane interne des mitochondries des cellules produisant des stéroïdes. La prégnénolone diffuse alors dans la membrane du réticulum endoplasmique où elle est convertie en deux androgènes, l'androstènedione et la testostérone (T). Cette synthèse d'androgènes se fait en plusieurs étapes. La prégnénolone peut, en effet, être convertie en progestérone par l'intermédiaire de la 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase (3β-HSD). La progestérone va alors être hydroxylée par le complexe du cytochrome P450 17α en 17α-hydroxyprogestérone qui, à son tour, sera métabolisée en androstènedione par ce même complexe enzymatique. La synthèse d'androstènedione à partir de la prégnénolone est également possible par une autre voie de synthèse parallèle, la voie Δ5. La prégnénolone peut en effet être hydroxylée par le cytochrome P450 17α en 17α-hydroxyprégnénolone puis métabolisée en déhydroépiandrostérone (DHA) sous l'action de ce même complexe enzymatique. La DHA est alors convertie en androstènedione par la 3β-HSD. La 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase (17β-HSD) convertit l'androstènedione en T, cette voie de synthèse étant réversible. Le cytochrome P450 aromatase, présent dans le réticulum endoplasmique, convertit l'androstènedione et la T en œstrone et E2 respectivement. L'œstrone peut également être convertie en E2 sous l'action de la 17β-HSD. Une autre voie de métabolisme de la T est sa conversion en 5α-dihydrotestostérone, un androgène non aromatisable, sous l'action d'une enzyme appelée la 5α-réductase.

Comme le cholestérol, l'E2 est une molécule lipophile. Cette propriété permet à l'E2 de traverser les bicouches lipidiques constituant la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire. Néammoins, de par ce caractère hydrophobe, cette hormone, comme d'autres stéroïdes, se complexe à des protéines plasmatiques (« steroid binding protein », SBP) lui

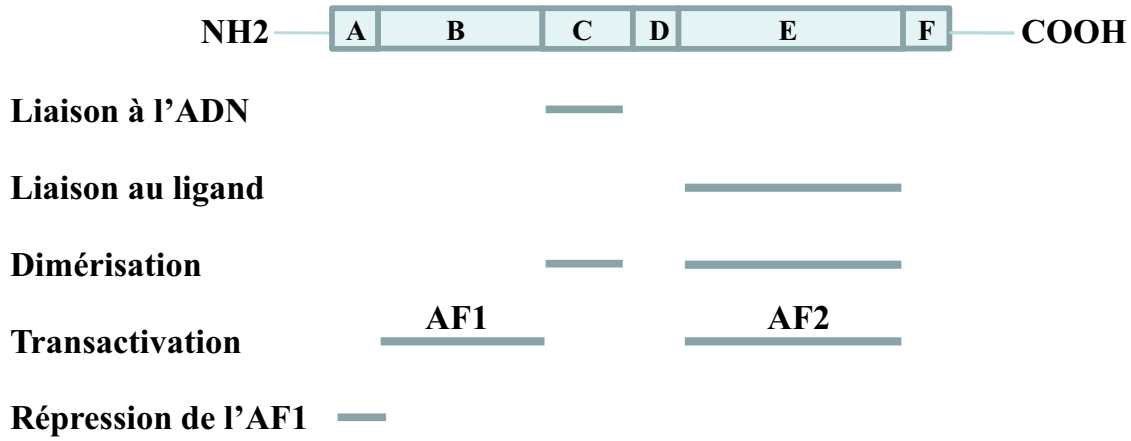


Figure 2 : Schéma des différents domaines fonctionnels du récepteur alpha des œstrogènes. D'après Robinson et Rechavi, 2003. Les fonctions principales associées aux différents domaines du récepteur sont indiquées. AF: fonction d'activation de la transactivation.

permettant d'être transportée par le sang jusqu'au niveau de ses organes ou tissus cibles. La signalisation œstrogénique nécessite enfin, au niveau cellulaire, la participation de récepteurs spécifiques de cette hormone, appelés récepteurs aux œstrogènes (ER).

I-2 MODES D'ACTION DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES (ER)

I-2.1 Historique/Généralités

Les ERs sont apparus dans la littérature dans les années 60 suite à leur caractérisation par des méthodes utilisant des drogues marquées. Le récepteur aux œstrogènes ERα a été cloné chez l'homme en 1986. Par la suite, un deuxième récepteur humain fut cloné, ERβ (Mosselman *et al*., 1996). Enfin, beaucoup plus récemment, après la caractérisation de ces ER nucléaires, est apparue la notion d'un troisième type de récepteur aux œstrogènes, localisé au niveau de la membrane cellulaire. Cette protéine appelée GPR30 appartient à la famille des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (GPR) (Revankar *et al*., 2005).

Les ERs sont des facteurs de transcription appartenant à la sous-famille des récepteurs aux stéroïdes, qui elle-même appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Cette superfamille inclut également des récepteurs à d'autres hormones -stéroïdes ou non-, comme les androgènes (AR), les progestagènes (PR), les glucocorticoïdes (GR), les minéralocorticoïdes (MR), les hormones thyroïdiennes (TR), la vitamine D3 (VDR) et des régulateurs de peroxysomes (PPAR). L'ensemble de ces récepteurs module l'expression de gènes cibles en agissant notamment comme des facteurs de transcription ligand-dépendants (Beato *et al*., 1995; Mangelsdorf *et al*., 1995). Cette superfamille contient également des récepteurs dits orphelins, car ne possédant pas de ligands physiologiques connus, ou n'ayant pas la capacité à fixer un ligand, comme par exemple Nurr1 (« nuclear receptor-related 1 ») (Germain *et al*., 2006; Wang *et al*., 2003b).

Dans leur état inactif, les ERs peuvent être présents au sein du noyau dans des complexes comprenant d'autres protéines nucléaires. La fixation du ligand initie alors un changement de conformation des ERs provoquant la dissociation de ces protéines nucléaires, la dimérisation du récepteur et la liaison de cet homodimère avec une séquence spécifique de l'ADN, l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE). De façon classique, le complexe E2-ER se fixe à l'ERE et adopte alors une structure favorable aux recrutements de cofacteurs régulant la transcription (Hall *et al*., 2002). Ces événements sont permis par l'organisation modulaire du récepteur en 6 domaines fonctionnels (**Figure 2**) (Klinge, 2000). La séquence

du domaine A/B N-terminal est peu conservée au sein de la superfamille et est le siège d'une fonction de transactivation (AF) appelée AF1 dont l'activité dépend du contexte cellulaire. Le domaine C est le domaine de liaison à l'ADN, appelé « DNA binding domain » (DBD) dont l'organisation en deux doigts de zinc permet la formation d'une structure tertiaire capable d'interagir avec une séquence spécifique d'ADN appelée « hormone responsive element » (HRE) comme l'ERE. Ce domaine C est le plus conservé au sein des membres de la superfamille, dont il constitue la signature phylogénétique. Le domaine D est un domaine « charnière » dont la séquence est très peu conservée. Le domaine E, quant à lui, est impliqué dans de nombreuses fonctions des récepteurs nucléaires, incluant leur dimérisation, la fixation au ligand et contient la fonction de transactivation appelée AF2. Enfin, le domaine F est un domaine dont la séquence est peu conservée au sein de la superfamille, mais qui aurait une influence spécifique dans le cas du ERα, en permettant une modulation de l'activité du récepteur lorsqu'il lie des ligands, soit agonistes soit antagonistes (Bourguet *et al*., 2000; Peters and Khan, 1999; Robinson-Rechavi *et al*., 2003).

Chez la plupart des Vertébrés, 2 gènes codent des ERs, les gènes *ERα* et *ERβ*. Ces deux isoformes présentent, au niveau protéique, une certaine conservation, mais possèdent des activités transcriptionnelles différentes en fonction du ligand, du promoteur et du contexte cellulaire. Les séquences primaires des domaines C et E présentent 96% et 58% d'identité entre ERα et ERβ, respectivement (Mosselman *et al*., 1996), tandis que celles des domaines A/B et F sont très divergents. La conservation des domaines C et E qui sont respectivement à l'origine de la liaison du récepteur à l'ADN et au ligand suggère donc qu'ERβ comme ERα est capable de lier des composés œstrogéniques et d'activer la transactivation de gènes possédant un ERE sur leurs régions promotrices. Mosselman et ses collègues ont ainsi montré *in vitro* qu'ERβ tout comme ERα est capable d'induire, après transfection transitoire, la transcription d'un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle du promoteur minimal TK et d'un ERE en présence d'E2. Cette induction est totalement bloquée en présence d'$ICI_{182,780}$, connu à l'époque pour être un antagoniste des ERα, et s'avérant ainsi être un antagoniste non sélectif des ERs. Cependant, le niveau de transactivation du gène rapporteur en présence d'E2 est plus élevé pour ERα que pour ERβ (Mosselman *et al*., 1996). Ces données indiquent qu'ERα et ERβ ne sont pas redondants mais possèdent des propriétés fonctionnelles proches mais différentes. Ceci a ensuite été validé par de nombreuses études, et en particulier par les données obtenues *in vivo* chez des souris « knock-out » (KO) dont l'expression pour l'un ou l'autre des ERs a été invalidée (ERαKO et ERβKO; Couse and Korach, 1999).

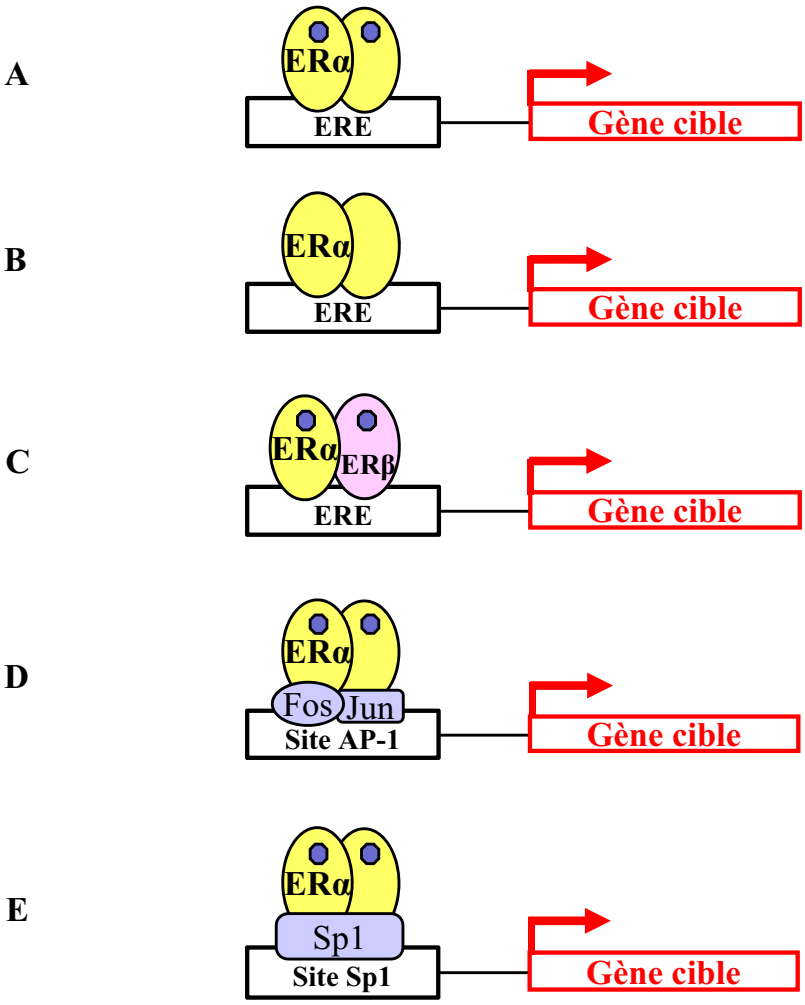


Figure 3 : Modes de recrutement du ERα sur les promoteurs de ses gènes cibles. La situation représentée ne considère que le cas d'une séquence régulatrice située en amont du site d'initiation de la transcription. Le ERα peut être recruté *via* des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) de façon ligand-dépendante (A) mais aussi en absence de ligand (B), sous forme d'homodimère (A,B) ou d'hétérodimère, avec par exemple ERβ (C). D'autre part, le ERα peut s'associer à l'ADN par le biais d'interactions avec des facteurs AP-1, comme Fos et Jun (D), ou *via* le facteur Sp1 (E). Ces deux types de facteurs reconnaissent leurs motifs spécifiques au niveau des séquences régulatrices des gènes cibles de l'E2.

I-2.2 Actions génomiques et non génomiques

I-2.2.1 Actions génomiques

Les ERs sont des facteurs de transcription inductibles par leur ligand (Robinson-Rechavi *et al*., 2003). Suivant sa liaison au ligand, un dimère de ER peut se fixer sur les régions promotrices de ses gènes cibles, pour activer ou réprimer leur transcription. La modulation de la transcription de gènes cibles faisant suite à ce recrutement constitue les effets dits génomiques des ERs, dits « lents », car faisant intervenir de nombreux cofacteurs des ERs ainsi que la « machinerie » de transcription. Le recrutement des ERs au niveau de régions régulatrices de la transcription peut se faire de manière directe, *via* l'interaction de son domaine C avec les ERE, mais également de façon indirecte, par l'intermédiaire d'interaction protéine/protéine avec d'autres facteurs de transcription.

I-2.2.1a La voie génomique directe

La séquence ERE, dont le consensus a été défini en 1989, est constituée de 2 demi-sites palindromiques inversés séparés de 3 nucléotides formant la séquence consensus GGTCAnnnTGACC (Klein-Hitpass *et al*., 1998). Cependant, les séquences ERE fonctionnelles retrouvées au sein des génomes sont souvent dégénérées, et l'affinité des ERs pour l'ERE va dépendre des nucléotides situés de chaque côté des demi-sites palindromiques (Anolik *et al*., 1996). Ainsi, seuls 7 types de séquences ERE sont pour le moment caractérisés comme permettant *in vivo* la liaison et la fonction du ERα (Lin *et al*., 2007). Il faut également noter que les relations existant entre l'affinité de liaison et l'activité de l'ERβ *in vivo* en fonction des variations de séquence ERE par rapport au consensus sont encore peu connues. Dans le cas de l'ERα, une divergence de la séquence de l'ERE de 1 à 3 nucléotides par rapport à la séquence consensus entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle (Anolik *et al*., 1995; Klinge *et al*., 1992; Schwabe *et al*., 1993).

La liaison des ERs sur un ERE se fait généralement sous forme de dimères, qui peuvent être de différentes natures : des homodimères ERα/ERα ou ERβ/ERβ, mais également des hétérodimères ERα/ERβ. Chaque dimère d'ER va se lier à un site ERE et le complexe ligand-ER-ERE va alors moduler positivement ou négativement la transcription du gène cible *via* le recrutement de coactivateurs ou corépresseurs par les AFs du ER (**Figure 3**). De plus, la séquence de l'ERE, intervenant comme un effecteur allostérique, provoque des modifications de conformations différentes selon le type d'ER, entraînant alors une

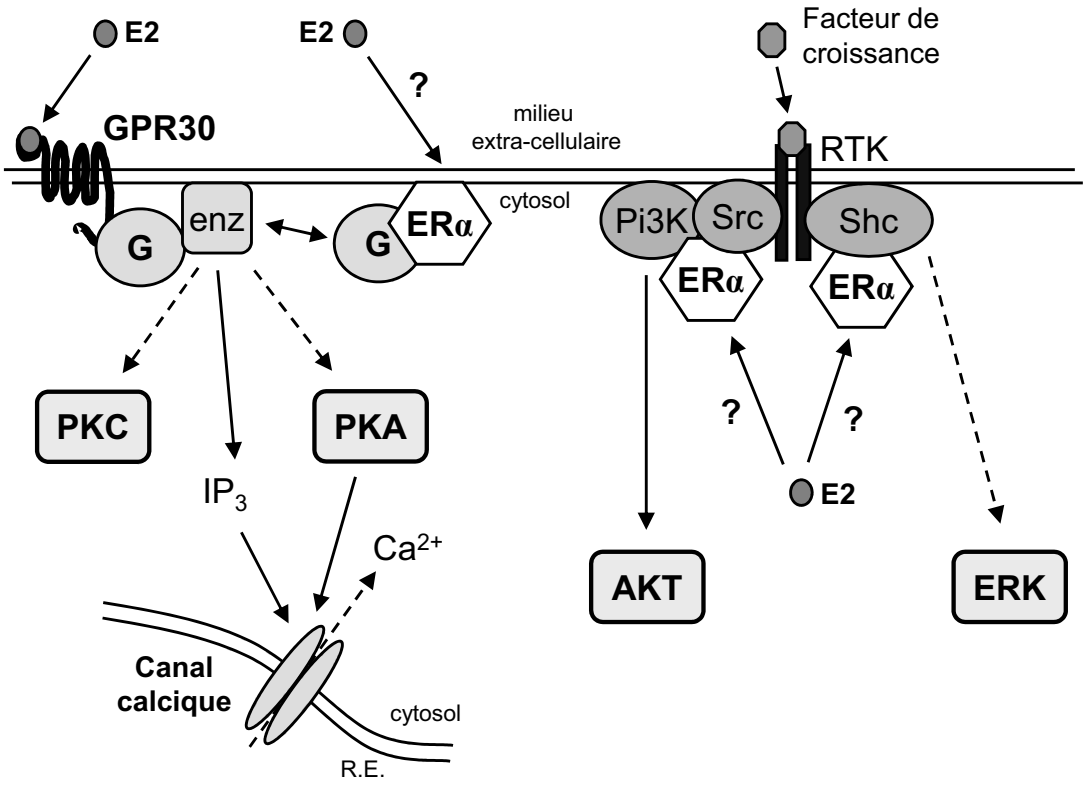


Figure 4 : Actions non-génomiques des œstrogènes. Le récepteur α des œstrogènes (ERα) peut interférer avec des cascades de signalisation intracellulaires, notamment la voie de la kinase ERK en interagissant avec la protéine adaptatrice Shc, ou la voie Pi3K-AKT en interagissant avec la kinase p60-Src et la Pi3K. Ces voies sont généralement activées par des facteurs de croissance *via* des récepteurs à activité tyrosine-kinase (RTK). Le caractère ligand-dépendant ou non de ces modulations reste cependant soumis à controverse. Le ERα peut également interagir avec des petites protéines G qui peuvent en retour activer une enzyme génératrice de seconds messagers (enz) comme l'inositol triphosphate (IP_3) ou les protéines kinases A ou C (PKA, PKC), et déclencher la libération d'ion calcium par le réticulum endoplasmique (R.E.). Les œstrogènes peuvent également activer ces voies dépendantes des protéines G par le biais d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, GPR30. ERK: «extracellular signal regulated kinase»; GPR30: «G protein coupled receptor of 30 kDa»; Pi3k: «phosphoinositol triphosphate-dependent kinase»; Shc: «Src homologous and collagen»; Src: «rous sarcoma oncogene of 60 kDa».

modification de recrutement des cofacteurs (Klinge, 2001). En plus de cette spécification en *cis*, le contexte cellulaire influence également l'activité transcriptionnelle des ERs, *via* une modulation en *trans*. En effet, des expériences de transfection transitoire ont montré que l'activité d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un ERE est différente selon le type cellulaire considéré. Ceci reposerait notamment sur une mobilisation différentielle de cofacteurs par l'ER en fonction du contexte cellulaire, reflétant dans certains cas l'existence de facteurs de transcription cellule-spécifiques.

I-2.2.1b La voie génomique indirecte

De nombreux gènes régulés par l'E2 ne présentent pas d'ERE au sein de leurs régions promotrices. Une partie de ces gènes peut cependant être sous le contrôle transcriptionnel des ERs, *via* leur recrutement indirect sur ces promoteurs. En effet, les ERs peuvent interagir avec des facteurs de transcription de type Fos et Jun, liés à leur site spécifique appelé AP1 (« activating protein 1 » ; Kushner *et al*., 2000), ou également avec le facteur de transcription Sp1 (« specificity protein 1 ») lié à son propre élément de réponse (Saville *et al*., 2000) (**Figure 3**).

I-2.2.2 Actions non génomiques (membranaires)

Par opposition aux effets génomiques, l'E2 induit également des réponses cellulaires dites « rapides », présentant des délais de réponse de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes, et qui ne peuvent donc pas être dues à la modulation transcriptionnelle directe *via* des ERs intranucléaires. Ces actions œstrogéniques non génomiques passent par l'activation et la modulation de l'activité de voies de signalisation intracellulaires (**Figure 4**) telles que les cascades des « mitogen-activated protein kinases » (MAPKs) (Zhang *et al*., 2004) ou des « phosphoinositide 3-kinase » (PI3K) (Zhang and Trudeau, 2006). Ces réponses cellulaires pourraient être en partie médiées au niveau membranaire par un récepteur aux œstrogènes, qui interagirait avec des protéines impliquées dans l'initiation de ces cascades. Ainsi, une protéine appelée ER-X serait présente dans les microinvaginations membranaires et permettrait de favoriser les interactions entre différents signaux de transduction. La présence de cette protéine a été mise en évidence sur des extraits de cortex de souris ERαKO (Toran-Allerand *et al*., 2002). D'autres études ont montré que les ERs nucléaires classiques pourraient également être localisés en faible quantité dans ces microinvaginations membranaires (Behl, 2002; Toran-Allerand *et al*., 1999). Enfin, plus récemment, ERα a été montré comme étant capable de recruter des membres de la famille des petites protéines G et ainsi d'activer des

voies de signalisation impliquant la protéine kinase A (PKA) ou la protéine kinase C (PKC) ou encore d'agir sur des canaux calciques intracellulaires (Zhang and Trudeau, 2006). Un récepteur membranaire des œstrogènes, appelé GPR30, a également récemment été identifié (Filardo *et al*., 2002; Revankar *et al*., 2005). Il serait impliqué dans certains effets non génomiques notamment au niveau du système nerveux central (Brailoiu *et al*., 2007; Jacobi *et al*., 2007). Ce récepteur appartiendrait à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et agirait au niveau de la membrane plasmique (Funakoshi *et al*., 2006). GPR30, provoquerait alors la modulation de cascades de signalisation comme celle de la PKA (Filardo *et al*., 2002).

I-2.3 Trois ERs chez les poissons

Des gènes codant des ERs sont présents dans les génomes des mammifères, mais également dans ceux des vertébrés ovipares, oiseaux, reptiles, amphibiens et poissons. Chez ces espèces, les ERs ont particulièrement été étudiés pour les effets qu'ils exercent dans le contrôle de la production hépatique de vitellogénine, principal précurseur des réserves de l'œuf chez les ovipares et intervenant dans les mécanismes du développement embryonnaire. Il faut d'ailleurs noter que la séquence ERE consensus a été définie à partir du gène de la vitellogénine de Xénope (Klein-Hitpass *et al*., 1986). Les données concernant les actions des ERs au niveau du complexe hypothalamo-hypophysaire, sont par contre très limitées chez ces espèces, la majeure partie des informations existant chez les poissons. Les données présentées ici seront donc restreintes aux ERs dans le cerveau des poissons téléostéens.

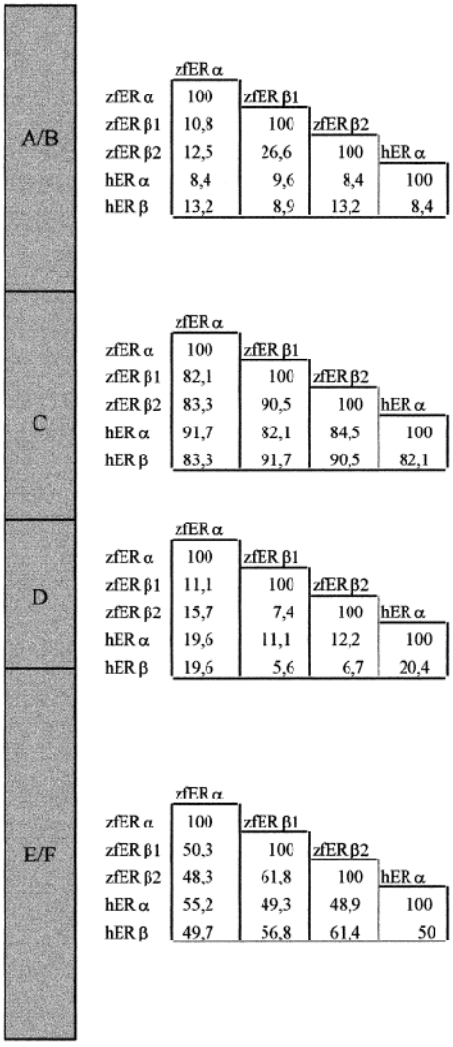
I-2.3.1 Caractéristiques

Chez les poissons comme chez les mammifères, il existe deux grands sous-types de protéines ERs : ERα et ERβ ayant la même organisation en 6 différents domaines fonctionnels. Cependant, suite à une duplication précoce du génome des téléostéens au cours de l'évolution (Robinson-Rechavi *et al*., 2001), ces espèces possèdent deux gènes distincts codant des ERβ : ERβ1 et ERβ2. Ces deux formes de récepteurs ont été décrites, entre autres, chez le poisson chat (Xia *et al*., 1999), le poisson rouge (Choi and Habibi, 2003), le tambour brésilien (Hawkins *et al*., 2005) et le poisson zèbre (Menuet *et al*., 2002). Des analyses phylogénétiques (**Figure 5**) ont ainsi montré qu'il existe environ 50% d'identité entre le ERα humain et le ERα de poisson zèbre (zfERα). De même, l'identité entre le zfERβ1 ou zfERβ2 et le ERβ humain est d'environ 50% (Menuet *et al*., 2002). Chez le poisson zèbre, les formes ERβ1 et ERβ2 ont 40% d'identité avec la forme α du ER et 51,5% d'identité entre les deux formes β du ER (Menuet *et al*., 2002). Chez le poisson zèbre, la séquence du domaine A/B,

A

	zfERα	zfERβ1	zfERβ2	hERα
zfERα	100			
zfERβ1	40,5	100		
zfERβ2	39,4	51,5	100	
hERα	47,1	39	37,8	100
hERβ	40,9	44,4	46,8	37.6

B



A/B	zfERα	zfERβ1	zfERβ2	hERα
zfERα	100			
zfERβ1	10,8	100		
zfERβ2	12,5	26,6	100	
hERα	8,4	9,6	8,4	100
hERβ	13,2	8,9	13,2	8,4

C	zfERα	zfERβ1	zfERβ2	hERα
zfERα	100			
zfERβ1	82,1	100		
zfERβ2	83,3	90,5	100	
hERα	91,7	82,1	84,5	100
hERβ	83,3	91,7	90,5	82,1

D	zfERα	zfERβ1	zfERβ2	hERα
zfERα	100			
zfERβ1	11,1	100		
zfERβ2	15,7	7,4	100	
hERα	19,6	11,1	12,2	100
hERβ	19,6	5,6	6,7	20,4

E/F	zfERα	zfERβ1	zfERβ2	hERα
zfERα	100			
zfERβ1	50,3	100		
zfERβ2	48,3	61,8	100	
hERα	55,2	49,3	48,9	100
hERβ	49,7	56,8	61,4	50

Figure 5 : Comparaison des séquences des ADNc codant chaque sous-type de ER chez le poisson zèbre (zfERα, zfERβ1 et zfERβ2) et chez l'homme (hERα et hERβ). D'après Menuet *et al.*, 2002.
(A) Pourcentage d'identité généraux pour la région codante entière.
(B) Pourcentages d'identité existant au niveau de 4 régions correspondant aux domaines A/B, C, D et E/F des ERs.

qui contient la fonction de transactivation AF1, est très peu conservée entre les trois ERs (environ 15%), tout comme la séquence du domaine D (environ 10%). Le domaine C de liaison à l'ADN est quant à lui très conservé entre les 3 ERs (80 à 90%). Enfin, le domaine E/F permettant la liaison du ligand au récepteur incluant l'AF2 conserve 50% d'identité entre les zfERα, zfERβ1 et zfERβ2.

I-2.3.2 Différences fonctionnelles

Chaque sous-type de zfER est capable de se lier à E2 avec une forte affinité, le zfERβ2 ayant une affinité 1,8 fois plus élevée pour l'hormone que les deux autres formes de zfER (Menuet *et al*., 2002). Des expériences de transfection transitoire ont permis de montrer que les trois zfER sont capables d'activer la transcription d'un gène rapporteur ERE-TK-luciférase de façon croissante en fonction des doses d'E2. Le zfERβ2 est cependant plus sensible à de faible doses d'E2 (10^{-12} M) que les zfERα et zfERβ1 (Menuet *et al*., 2002). Enfin, chaque zfER est capable d'induire la transcription de l'ERE-TK-luciférase après liaison de différents métabolites de l'E2, l'œstrone, l'œstriol ou encore de perturbateurs endocriniens et d'analogues de synthèse comme le diethylstilbestrol. Par contre, aucune transactivation du gène rapporteur n'a été observée en présence de progestérone, T ou cortisol. La combinaison d'un traitement œstrogénique avec un ligand antagoniste des ERs, comme l'$ICI_{182,780}$ ou l'hydroxytamoxifène provoque le blocage de la transcription du gène rapporteur, montrant donc le rôle direct des ERs dans la transcription du gène rapporteur (Menuet *et al*., 2002). Des résultats similaires ont été observés chez le tambour brésilien, dans la mesure où chaque type de ER est capable d'activer la transcription de gènes rapporteurs et chaque sous-type d'ER présente une forte affinité pour les ligands comme l'E2, mais également les métabolites de l'E2 et les perturbateurs endocriniens (Hawkins and Thomas, 2004). Bien que chez les mammifères les données obtenues *in vitro* en transfection transitoire indiquent que le ERα est un facteur de transcription plus efficace que le ERβ, il semblerait que ce ne soit pas le cas chez les poissons, les différentes formes d'ER étant capables d'activer la transcription de gènes rapporteurs de façon similaire (A. Menuet, données non publiées).

I-2.3.3 Effets génomiques et non génomiques

Il existe peu d'informations sur les mécanismes des voies de signalisation œstrogénique dans le cerveau des poissons. Certains gènes comme le gène *cyp19a1b* peuvent être régulés par la voie génomique directe faisant intervenir un ERE présent sur le promoteur proximal de ces gènes, (Le Page *et al*., 2006; Menuet *et al*., 2005). Cet ERE est absolument nécessaire à la

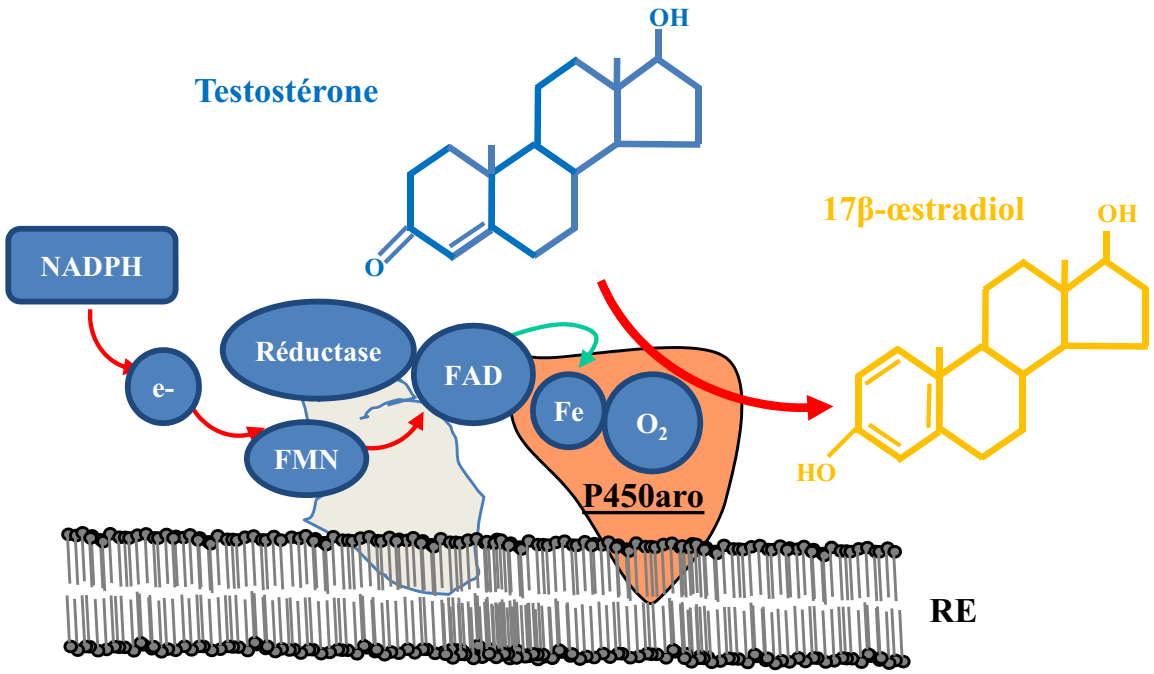


Figure 6 : Représentation schématique du complexe enzymatique contenant le cytochrome P450 Aromatase et la NADPH cytochrome P450 réductase. Adapté de Conley et Hinshelwood, 2001. Le complexe enzymatique est intégré à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et permet la conversion de la testostérone en œstradiol. FAD: adénine dinucléotide; FMN: flavin mononucléotide; e-: électrons issus de la réduction de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH).

régulation du gène *cyp19a1b* par l'E2. En effet, sa mutation entraîne une inhibition complète de la transactivation d'un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un fragment de 0,5 kb du promoteur du gène *cyp19a1b*. De plus, une coopération avec un facteur glial, se liant au niveau de ce promoteur, est également nécessaire pour l'activation optimale du gène rapporteur par l'E2 (Le Page *et al*., 2008). Le rôle de la T et de l'E2 sur l'expression du gène codant la sous-unité beta de la gonadotropine 2 (sGTHII β) a également été particulièrement étudié chez le saumon. Le promoteur *sGTHII β* contient plusieurs EREs et la transcription d'un gène rapporteur placé sous le contrôle d'une partie du promoteur de la sGTHII β contenant deux EREs est induite par les stéroïdes (T et E2) après transfection dans des cellules hypophysaires de truite. De plus, la mutation d'un des EREs entraîne une inhibition de l'induction (Xiong *et al*., 1994). Il existerait également une protéine équivalente à GPR30, identifiée et clonée dans les ovaires du tambour brésilien ; un traitement œstrogénique des membranes plasmiques extraites d'ovaires de ce poisson provoque l'activation d'une protéine G stimulatrice qui résulte en l'augmentation de la production d'AMPc. Le clonage de ce GPR30 a permis de montrer que la fixation de l'E2 sur cette protéine réduit la maturation des ovocytes de ce poisson et des ovocytes de poisson zèbre *in vitro* suggérant un rôle potentiel de GPR30 dans le maintien des ovocytes en méiose chez ces espèces. De plus, l'injection d'une séquence antisens de GPR30 a confirmé ces résultats, l'effet inhibiteur de l'E2 sur la maturation ovocytaire étant alors bloqué (Pang *et al*., 2008).

I-3 L'AROMATASE, UNIQUE ENZYME DE SYNTHESE DE L'E2

I-3.1 Généralités

La source majeure d'E2 est la gonade, mais il existe également une synthèse locale dans de nombreux tissus, notamment dans le tissu adipeux, l'os, l'utérus et le cerveau (Conley and Hinshelwood, 2001; Lephart, 1996). L'E2 est le produit de la conversion de la T par une enzyme, le cytochrome P450 aromatase, appelé usuellement aromatase. L'aromatase fait partie de la superfamille des enzymes des cytochromes P450. C'est la seule enzyme appartenant à cette superfamille qui soit capable de générer le cycle aromatique caractéristique des composés œstrogéniques, et elle est donc le seul membre de la sous-famille CYP19. La réaction enzymatique complète permettant le métabolisme des androgènes aromatisables en œstrogènes fait intervenir un complexe composé de 2 éléments: l'aromatase couplée à une flavoprotéine ubiquitaire, le NADPH-cytochrome P450 réductase (**Figure 6**). L'aromatase et la réductase sont majoritairement localisées dans le réticulum endoplasmique,

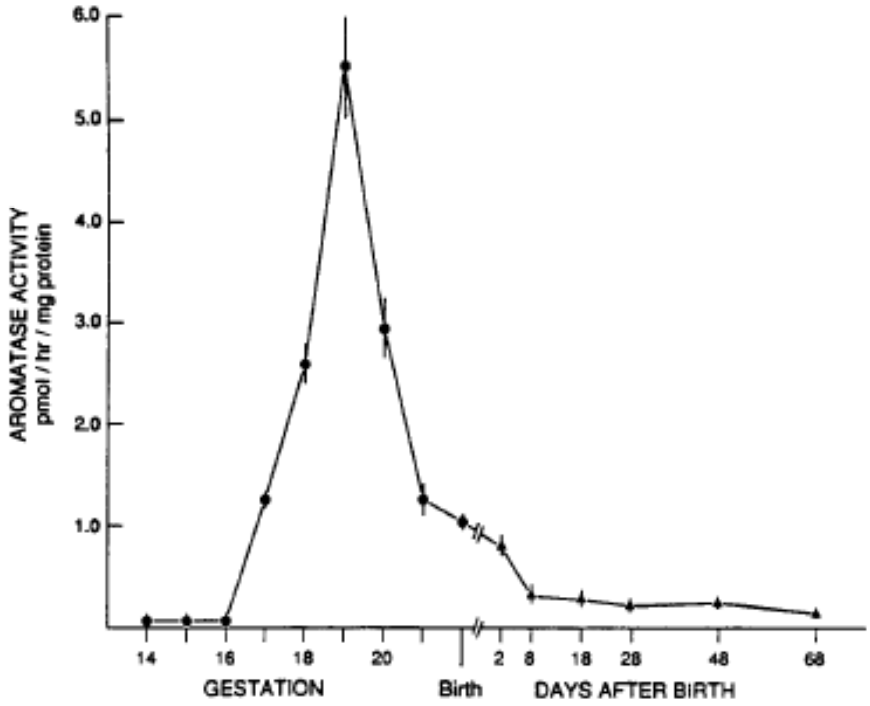


Figure 7 : Activité enzymatique du cytochrome P450 aromatase dans l'aire préoptique et l'hypothalamus de rats. D'après Lephart, 1996. L'activité enzymatique de l'aromatase a été déterminée durant le développement prénatal (représenté par les ronds) et postnatal (triangles), en injectant une concentration saturante en testostérone (le substrat de l'aromatase) marquée au tritium.

mais peuvent toutefois être trouvées dans la membrane plasmique (Conley and Hinshelwood, 2001; Lephart, 1996).

Dans la suite de cette introduction, nous concentrerons notre attention sur l'aromatase cérébrale et illustrerons le fait qu'il existe des différences majeures, concernant cette enzyme, entre le cerveau des mammifères ou des oiseaux et celui des poissons téléostéens.

I-3.2 Activité enzymatique

La séquence de l'aromatase est fortement conservée chez les vertébrés. En effet, les enzymes clonées chez les mammifères et les poissons présentent entre 50 et 90% de similarité de séquences peptidiques (Conley and Hinshelwood, 2001). Cependant, ces différences observées entre espèces se situent surtout au niveau d'acides aminés présents au sein de domaines non fonctionnels n'exerçant pas d'influence majeure dans les propriétés catalytiques de l'enzyme. Néanmoins, des différences majeures sont observées entre les poissons et les mammifères, en ce qui concerne l'aromatase cérébrale. En effet, chez les mammifères, l'activité enzymatique maximale de l'aromatase dans le cerveau est mesurée durant les périodes embryonnaire et périnatale (**Figure 7**) puis décline jusqu'à l'âge adulte (Lephart, 1996). Cette activité importante durant le développement participerait notamment à la mise en place du dimorphisme sexuel de certaines structures cérébrales, notamment celles à vocation neuroendocrine (Hutchison *et al*., 1994). Au contraire, chez les poissons, l'activité enzymatique de l'aromatase est faible au cours du développement embryo-larvaire et est maximale dans le cerveau des poissons sexuellement matures, au sein duquel, elle peut être de 100 à 1000 fois supérieure à celle mesurée chez les mammifères dans des régions correspondantes (Pasmanik and Callard, 1985; Pasmanik and Callard, 1988). Des études de microdissection, par « punching », combinées à des techniques biochimiques, ont permis de préciser que le potentiel exceptionnel d'aromatisation des poissons se situe majoritairement dans le cerveau antérieur, et en particulier, au niveau du télencéphale, de l'aire préoptique et de l'hypothalamus (Timmers *et al*., 1987). Des tests biochimiques ont permis de mettre en évidence que les androgènes aromatisables ont une affinité plus élevée pour l'aromatase chez le poisson rouge et le bar que l'enzyme humaine (Gonzalez and Piferrer, 2002; Zhao *et al*., 2001). Cependant, ces différences restent mineures et ne sauraient à elles seules expliquer l'exceptionnelle capacité d'aromatisation du cerveau des poissons. De plus, chez les poissons, l'activité enzymatique de l'aromatase au niveau cérébral varie non seulement en fonction de

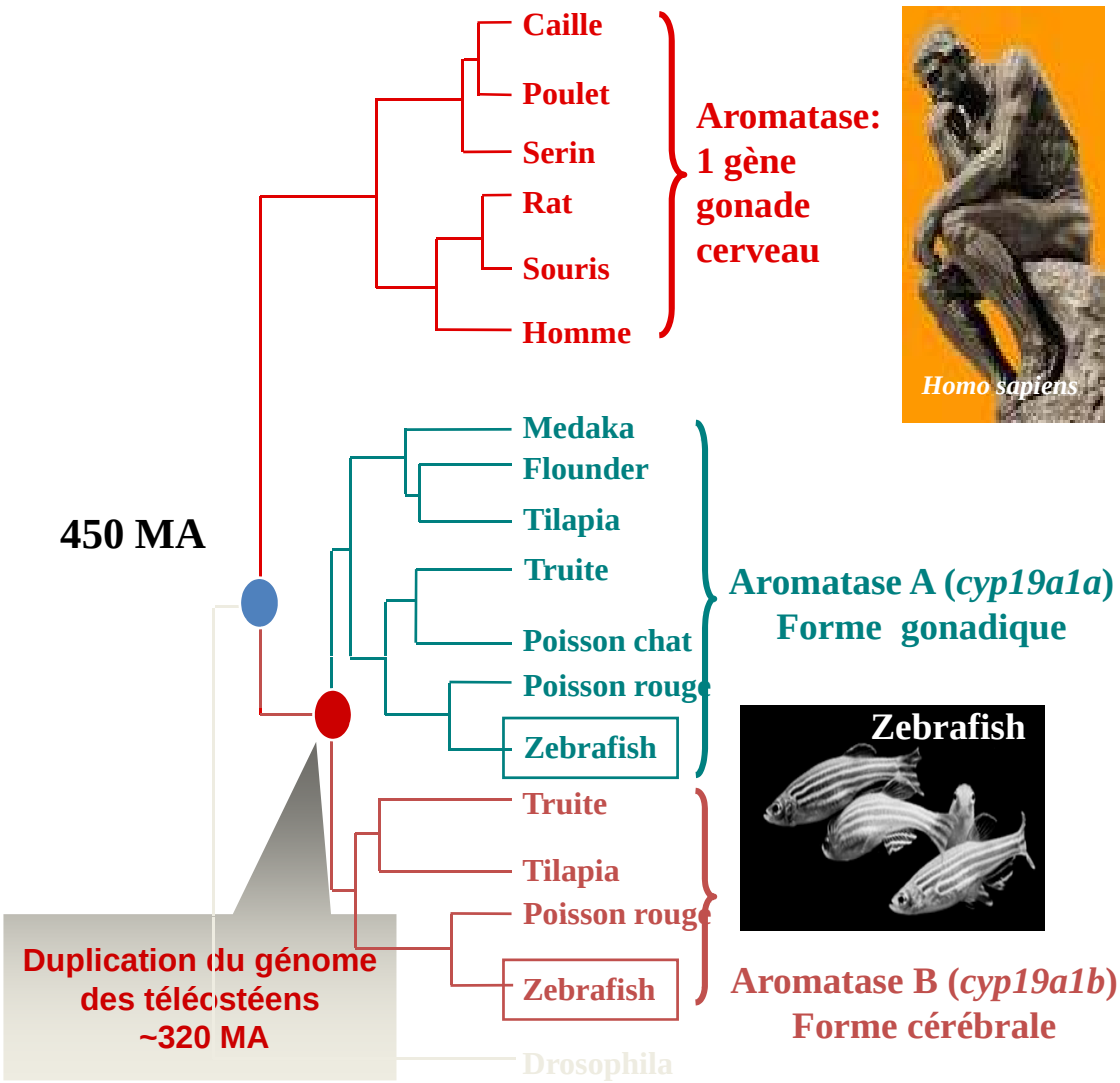


Figure 8 : Arbre phylogénétique des gènes codant l'aromatase. A la suite de la duplication du génome des poissons téléostéens, il y a 320 millions d'années, deux gènes codant une aromatase existent chez ces espèces. Une forme gonadique est codée par le gène *cyp19a1a* et une forme cérébrale est codée par le gène *cyp19a1b*. Les séquences des formes cérébrales des différentes espèces présentent une identité plus importante que celle existant entre la forme cérébrale et la forme gonadique de la même espèce (O. Kah, non publié)

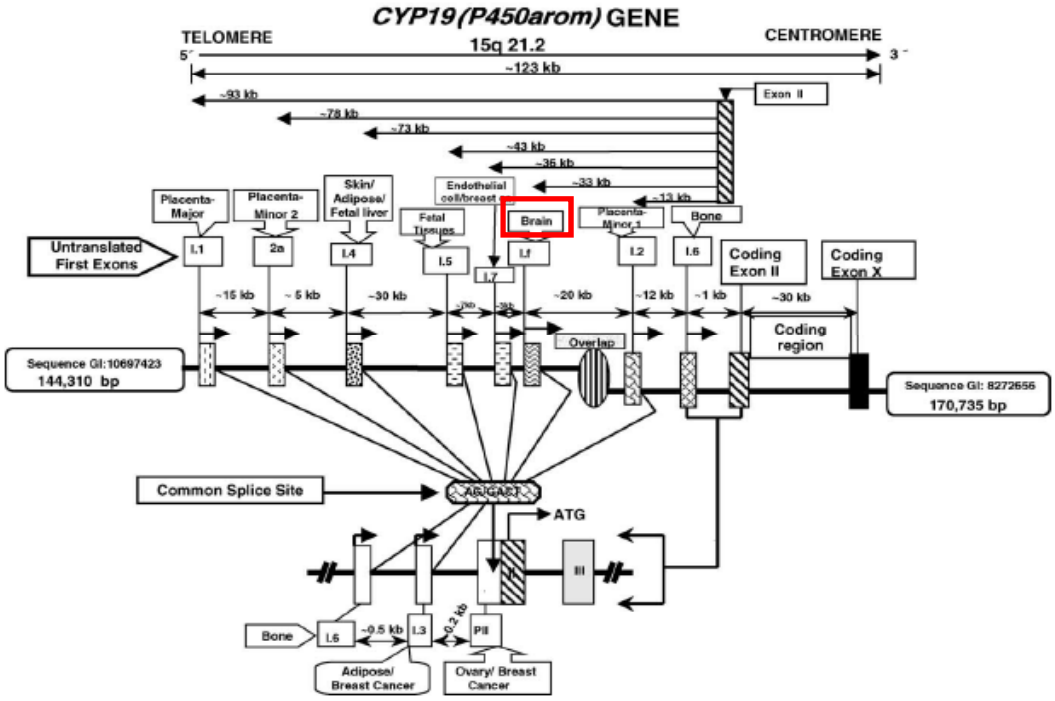


Figure 9 : Cartographie des promoteurs du gène *cyp19* humain. D'après Bulun *et al.*, 2003. L'utilisation tissu spécifique de ces promoteurs est indiquée, celui étant utilisé au sein du cerveau étant entouré en rouge. Bien que chaque tissu exprime des régions 5'UTR divergentes, les différents ARNm correspondants génèrent la même protéine.

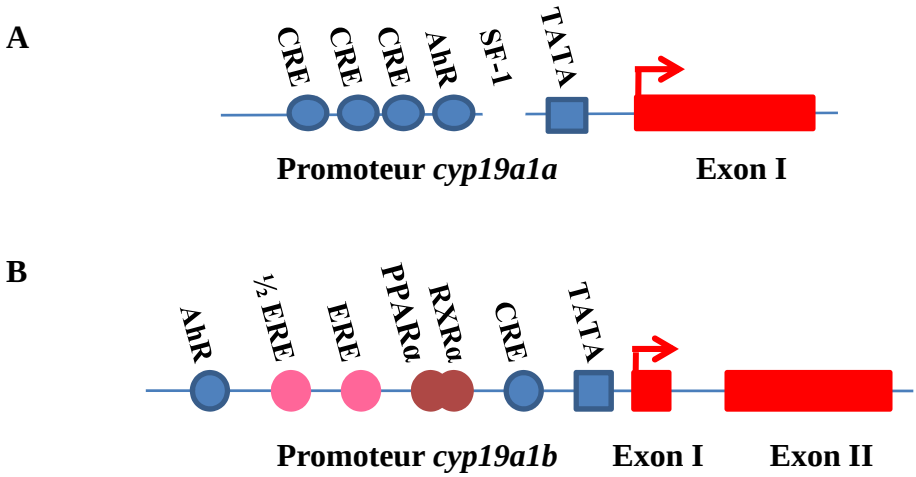


Figure 10: Schéma du promoteur des gènes *cyp19a1* du zebrafish. D'après Chiang *et al.*, 2001. Le gène *cyp19a1a* (A) code l'aromatase gonadique et *cyp19a1b* (B), code la forme cérébrale de l'aromatase. AhR: site de liaison pour le « aryl hydrocarbon receptor »; CRE: « cyclic AMP response element »; ERE: élément de réponse aux œstrogènes; PPARα: site de liaison pour le récepteur α des régulateurs du peroxysome; RXRα: site de liaison pour le récepteur α à l'acide rétinoïque 9-cis; SF-1: site de liaison pour le « steroidogenic factor 1 »; TATA: boîte TATA, site de recrutement pour la machinerie de transcription.

la période de reproduction, mais également en fonction de facteurs externes comme la température (Gonzalez and Piferrer, 2002; Zhao *et al*., 2001).

I-3.3 Une duplication du gène aromatase chez les poissons

Chez les mammifères et les oiseaux, un seul gène code l'aromatase (**Figure 8** et **Figure 9**). L'expression de ce gène est soumise à une régulation complexe de par l'emploi tissu-spécifique de multiples promoteurs. Les transcrits générés possèdent donc des régions 5'UTR (« untranslated region ») différentes, mais codent la même protéine (Bulun *et al*., 2003). Jusqu'à présent, seul le porc fait exception à cette règle, trois paralogues de l'aromatase ayant été décrits chez cet animal (Conley *et al*., 1997). L'isoforme de type I est présente dans les gonades, l'isoforme de type II dans le placenta et l'isoforme de type III est produite au moment du développement embryonnaire (Graddy *et al*., 2000).

En raison de la duplication évolutive du génome des poissons téléostéens, 2 gènes codant l'aromatase ont été décrits chez le poisson rouge (Tchoudakova and Callard, 1998), le poisson zèbre (Chiang *et al*., 2001), la truite (Valle *et al*., 2002), le bar (Blazquez and Piferrer, 2004), le tilapia (Chang *et al*., 2005), le flétan (van Nes *et al*., 2005) et le pejerrey (Strobl-Mazzulla *et al*., 2005) (**Figure 8**). Le gène *cyp19a1a* code l'aromatase A qui est exprimée principalement dans les ovaires et les testicules (**Figure 10A**). Le gène *cyp19a1b* est, quant à lui, à l'origine de la seconde forme d'aromatase, appelée aromatase B (**Figure 10B**) qui est majoritairement exprimée dans le cerveau et l'hypophyse. Bien que, au sein d'une même espèce, l'aromatase A et l'aromatase B aient de fortes homologies de séquences (62% d'identité dans le cas du bar), les formes cérébrales présentent une identité entre espèces plus importante (83% d'identité entre l'aromatase B de bar et celle de tilapia, par exemple). D'autre part, le niveau d'expression de l'aromatase B dans le cerveau est plus élevé que le niveau d'expression de l'aromatase A dans les gonades.

I-3.4 Distribution cérébrale de l'aromatase

Outre les différences d'activité de l'aromatase, une autre divergence majeure relative à cette enzyme entre mammifères et poissons, concerne la nature des cellules qui l'expriment dans le cerveau.

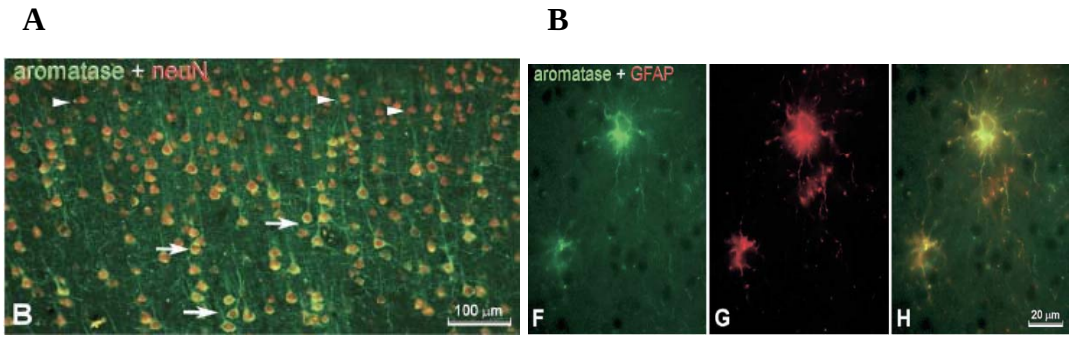


Figure 11: L'aromatase est exprimée dans les neurones chez l'Homme. D'après Yague *et al.*, 2006. Imagerie par microscopie confocale du cortex temporal humain montrant :
(A) Un comarquage entre l'aromatase (en vert) et NeuN (en rouge), un marqueur neuronal.
(B) Un exemple d'expression de l'aromatase (en vert) dans des astroytes humains marqués avec la GFAP (en rouge)

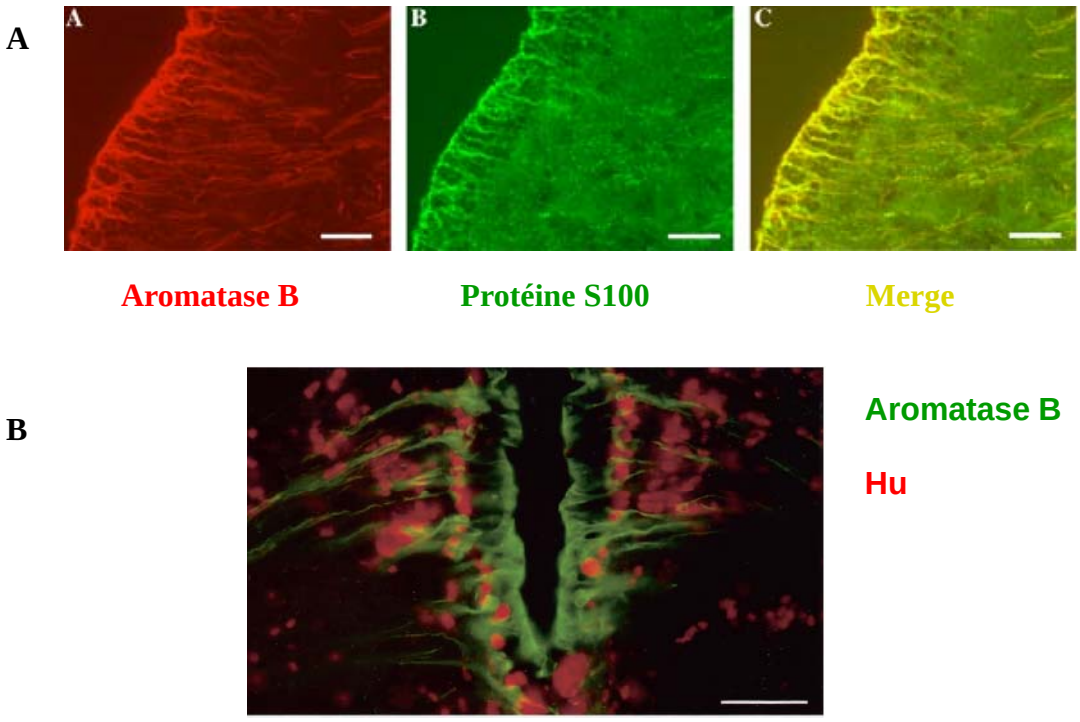


Figure 12 : L'aromatase est exprimée dans les cellules gliales radiaires chez les poissons téléostéens.
(A) Coupe transversale de l'hypothalamus antéroventral d'une truite arc-en-ciel marqué avec un anticorps anti-aromatase B (A, en rouge) et un anticorps anti-protéine S100 (B en vert), un marqueur de cellules gliales radiaires. La coexpression de ces deux protéines est montrée en C par la superposition des deux images qui donne une couleur jaune. D'après Pellegrini *et al.*, 2005.
(B) Coupe transversale du diencéphale d'un cerveau de poisson crapaud marqué avec un anticorps anti-aromatase B (en vert) et d'un anticorps anti-Hu (Hu est un marqueur de neurones, en rouge). L'absence de couleur jaune montre que l'aromatase n'est pas exprimée dans les neurones. D'après Forlano *et al.*, 2001.

I-3.4.1 Distribution de l'aromatase chez les mammifères et oiseaux

Chez les mammifères, différentes études ont montré que l'aromatase est principalement exprimée dans les corps cellulaires, les axones et les terminaisons nerveuses des neurones (**Figure 11**), au niveau de régions neuroendocrines intervenant dans le contrôle de la reproduction et du comportement reproducteur (Balthazart and Ball, 1998). Chez les oiseaux, l'aromatase a été détectée dans les axones, dendrites, terminaisons pré- et post- synaptiques des neurones de différentes régions cérébrales (Peterson *et al*., 2005). Cependant, en plus de ces localisations, de plus en plus d'études montrent que dans des conditions physiopathologiques, l'aromatase est exprimée *de novo* dans les astrocytes. En effet, suite à des lésions chimiques et/ou mécaniques dans l'hippocampe chez des souris et des rats, une forte expression de l'aromatase est observée dans des astrocytes réactifs avoisinant la lésion. Chez les rats et souris contrôles, l'expression d'aromatase est restreinte aux neurones (Garcia-Segura *et al*., 1999a). Des résultats similaires ont été obtenus chez les oiseaux lors d'une lésion hémi-latérale ; une très forte expression des messagers et de la protéine aromatase est observée dans les astrocytes avoisinant la lésion. Au contraire, dans l'hémisphère contrôle, l'aromatase est exprimée exclusivement dans les neurones comme en condition physiologique (Peterson *et al*., 2001).

Des études menées *in vitro* ont montré que l'aromatase peut également être exprimée dans des tumeurs d'origine gliale de rat ou humaine (Yague *et al*., 2004) ou encore dans des astrocytes provenant de cultures primaires de télencéphale de serin (Schlinger *et al*., 1994). De plus, des études récentes tendent à montrer une expression spécifique de l'aromatase dans des cellules gliales. En effet, chez l'Homme, des expériences de RT-PCR et d'immunohistochimie ont mis en évidence une expression de l'aromatase dans des neurones pyramidaux du cortex temporal, mais également dans des sous-populations d'astrocytes de cette même région (Yague *et al*., 2006). Plus récemment, l'expression de l'aromatase a été décrite dans les cellules gliales radiaires au niveau du cortex lors du développement embryonnaire de la souris (Martinez-Cerdeno *et al*., 2006).

I-3.4.2 Distribution de l'aromatase chez les poissons

Ces dernières études réalisées chez les mammifères sont particulièrement intéressantes dans la mesure où chez les poissons téléostéens, l'aromatase cérébrale est exprimée uniquement dans les cellules gliales radiaires (**Figure 12**). En effet, plusieurs travaux combinant hybridation *in situ* et immunohistochimie ont démontré que l'aromatase B est exclusivement exprimée dans

les cellules gliales radiaires dans le cerveau et l'hypophyse chez différentes espèces de poissons téléostéens, notamment chez le poisson crapaud (Forlano *et al*., 2001), la truite (Menuet *et al*., 2003), et le poisson zèbre (Menuet *et al*., 2005). D'autres études réalisées par immunohistochimie chez le pejerrey (Strobl-Mazzulla *et al*., 2005) et la girelle verte (Marsh *et al*., 2006) ont confirmé ces données. Il existe cependant des différences d'expression entre ces régions. Le plus grand nombre de cellules aromatase-positives est observé dans le cerveau antérieur principalement en bordure de ventricules au niveau du télencéphale, de l'aire préoptique, de l'hypothalamus médiobasal et également dans les bulbes olfactifs. Cette distribution est corrélée à une forte activité aromatase détectée dans ces mêmes régions (Timmers *et al*., 1987). D'autre part, chez le poisson crapaud, des doubles marquages immunohistochimiques ont suggéré qu'il n'y a presque jamais de coexpression entre aromatase B et Hu, un marqueur neuronal. Ceci confirme une expression de l'aromatase *quasi* restreinte, voire exclusive, aux cellules gliales radiaires chez ce poisson (Forlano *et al*., 2001).

I-3.5 Régulation de l'aromatase par les stéroïdes sexuels : androgènes et œstrogènes

Chez les mammifères et les oiseaux, si nous disposons d'un certain nombre d'informations sur la régulation du gène *cyp19* dans les gonades (Bourguiba *et al*., 2003; Carreau, 2002; Genissel *et al*., 2001), il en existe très peu sur l'expression de ce gène au niveau cérébral et la majeure partie des données porte sur la régulation de l'expression de l'aromatase par les stéroïdes. Dans le cerveau de fœtus, où la mise en place d'un dimorphisme sexuel de certaines structures cérébrales est due à une aromatisation de la T en œstradiol, les mécanismes régulant l'expression de l'aromatase ne sont pas connus. Cependant, ils ne semblent pas dépendre des androgènes. En effet, après gonadectomie de fœtus de singe et traitement à la T, l'activité de l'aromatase cérébrale n'est pas altérée (Roselli and Resko, 1986). Dans le cerveau adulte, des études ont montré que, chez les mammifères, le gène *cyp19* est régulé par les androgènes (Roselli and Resko, 1997). En effet, chez des rats adultes ayant subi une gonadectomie, les niveaux de transcrits de l'aromatase cérébrale et son activité enzymatique diminuent dans l'aire préoptique et l'hypothalamus. Après injection de T ou de 5α-dihydrotestostérone, un androgène non aromatisable, les niveaux d'ARNm et de l'enzyme sont restaurés (Abdelgadir *et al*., 1994). Chez les oiseaux, le gène *cyp19* est principalement régulé par les œstrogènes (Balthazart *et al*., 2003). Cependant, il existe une synergie entre la régulation de l'aromatase par les œstrogènes et les androgènes. En effet, chez la caille, la T régule l'aromatase ; cette régulation de l'aromatase passe par la conversion de la T en E2, mais également directement par des récepteurs aux androgènes. Un traitement à la T augmente le nombre de cellules

immunoréactives pour l'aromatase (Balthazart *et al*., 1992a). Chez la caille, l'utilisation d'un inhibiteur de l'aromatase provoque une diminution du nombre de cellules aromatase-positives dans certaines régions comme l'hypothalamus, tandis que le nombre de cellules est constant dans d'autres régions comme l'aire préoptique. Cette observation concorde avec le fait que les régions, où l'effet de la T est bloqué par l'inhibiteur d'aromatase, expriment l'aromatase et des ERs. Au contraire, dans les régions dépourvues d'ER, le nombre de cellules aromatase-positives ne diminue pas. Ceci indique donc que chez les oiseaux, même si une régulation androgénique existe, la régulation de l'aromatase est principalement placée sous contrôle œstrogénique (Balthazart *et al*., 1992a).

Chez les poissons téléostéens, le gène *cyp19a1b* est positivement régulé par l'œstradiol. Cette régulation œstrogénique a tout d'abord été suggérée par des expériences de Northern blot réalisées sur des ARN préparés à partir de poissons rouges traités à l'E2 (Gelinas *et al*., 1998), ainsi que des données de RT-PCR semi-quantitative suivant les quantités d'ARNm codant l'aromatase pendant le développement sur des larves de poisson zèbre (Kishida and Callard, 2001). En effet, l'E2 induit une augmentation des transcrits aromatase B et l'ICI $_{182,780}$, un antagoniste des récepteurs aux œstrogènes, bloque l'induction des transcrits suggérant donc une participation des zfERs dans la régulation œstrogénique du gène *cyp19a1b* (Kishida and Callard, 2001). Cette régulation œstrogénique des messagers du gène *cyp19a1b* a également été montrée chez d'autres espèces comme le poisson crapaud, la rascasse et le medaka (Forlano and Bass, 2005; Halm *et al*., 2002; Melo and Ramsdell, 2001). Plus récemment, des études *in vivo* et *in vitro* menées dans notre équipe ont permis de confirmer cette régulation positive de l'aromatase par l'œstradiol et d'en préciser les mécanismes moléculaires. En effet, une très forte régulation de l'aromatase B par l'œstradiol a été mise en évidence par des expériences d'hybridation *in toto* et d'immunohistochimie sur des embryons de poisson zèbre de 48h. De plus, cette forte augmentation oestrogéno-dépendante des transcrits et de la protéine aromatase B est complètement inhibée par l'$ICI_{182,780}$, confirmant définitivement l'implication des ERs dans la régulation du gène *cyp19a1b* (Menuet *et al*., 2005). D'autre part, Menuet *et al* (2005) ont montré par immunohistochimie que cette forte expression d'aromatase B, après traitement à l'E2, n'est observée que dans les cellules gliales radiaires. Des expériences *in vitro* ont également montré que la transcription d'un gène rapporteur *cyp19a1b*-luciférase, co-transfecté avec un vecteur codant un ER, n'est induite par l'E2 que dans certains contextes cellulaires illustrant la nécessité de facteurs cellule-spécifiques. En effet, la forte induction du gène rapporteur

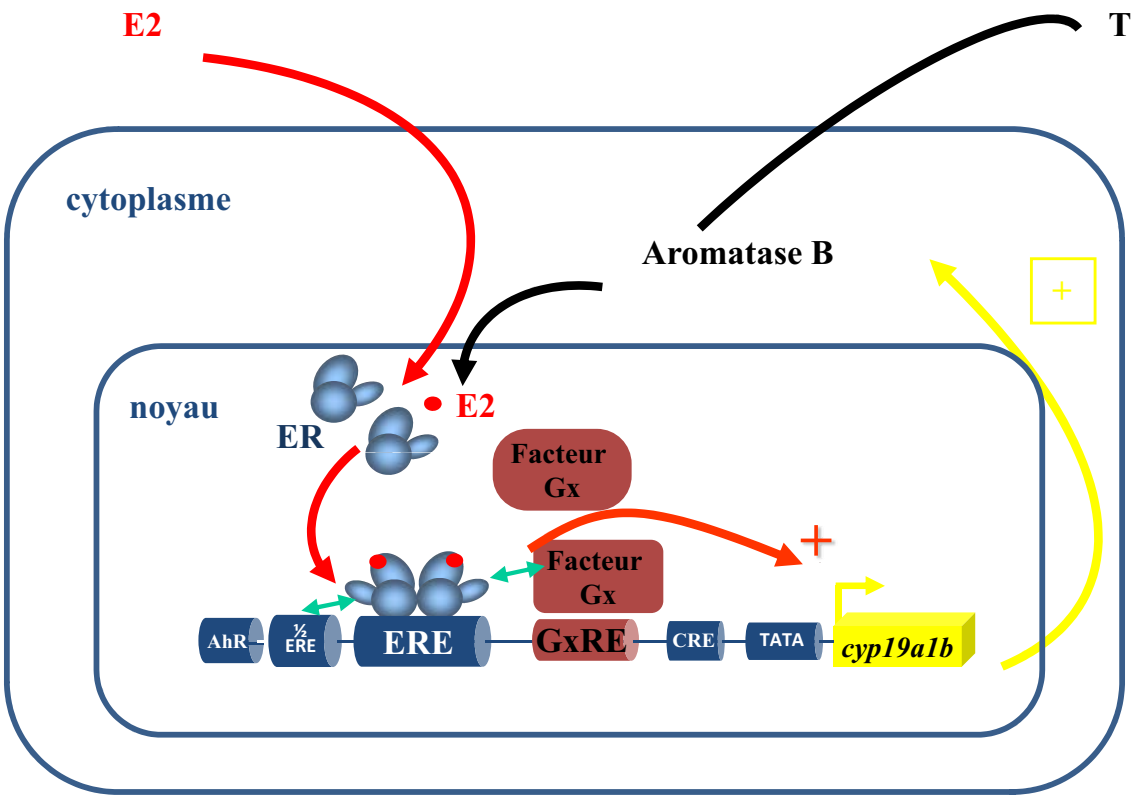


Figure 13 : Représentation schématique de la régulation du gène *cyp19a1b* par l'œstradiol dans les cellules gliales radiaires. La coopération entre ER et un facteur nommé Gx (spécifique des cellules gliales radiaires) se fixant sur un élément de réponse appelé GxRE conduit à une forte régulation positive du gène *cyp19a1b* uniquement dans ces cellules. AhR : site de liaison pour le « aryl hydrocarbon receptor »; CRE : « cyclic AMP response element »; E2 : œstradiol; ERE : élément de réponse aux œstrogènes; T : testostérone; TATA : boîte TATA, site de recrutement pour la machinerie de transcription.

cyp19a1b-luciférase n'est observée que dans des lignées cellulaires « neurogliales » comme les P19 différenciées (cellules issues d'un tératocarcinome de rat qui se différencient en cellules gliales et en neurones en présence d'acide rétinoïque) et la lignée U-251 MG, lignée d'astrocytes humains (Le Page *et al*., 2006; Menuet *et al*., 2005). L'induction du gène rapporteur *cyp19a1b*-luciférase nécessite donc la présence de ER, d'un contexte neuroglial et implique également un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) fonctionnel sur le promoteur proximal du gène *cyp19a1b* (Kazeto *et al*., 2001) dont la mutation aboutit à la suppression complète de l'induction du gène rapporteur (Menuet *et al*., 2005). D'autre part, la délétion de différentes régions situées en aval de l'ERE sur le promoteur du gène *cyp19a1b* a permis de localiser un élément de réponse qui serait impliqué dans la spécification neurogliale de la régulation de ce gène (Le Page *et al*., 2008). Cet élément est constitué d'un motif de 20 paires de base et a été nommé GxRE (élément de réponse au facteur glial x, puisque la nature du facteur glial reste inconnue). Différentes mutations de la séquence GxRE conduisent à une diminution de l'induction du gène rapporteur *cyp19a1b*-luciférase allant parfois jusqu'à une perte d'induction de 80% (Le Page *et al*., 2008). Cependant, cette induction n'est jamais complètement abolie suggérant l'existence d'une synergie fonctionnelle entre le GxRE et l'ERE. Enfin, l'insertion de la séquence GxRE dans une construction ERE-TK-luciférase, transfectée dans différentes lignées gliales ou non, aboutit à une induction du gène rapporteur uniquement dans des lignées neurogliales. Ceci confirme donc le fait que le GxRE confère une spécificité gliale à l'expression du gène *cyp19a1b* (Le Page *et al*., 2008). La régulation du gène *cyp1a1b* par l'E2 dans des cellules de type glial nécessite donc la présence de l'ERE, du GxRE et la présence d'ERs (Le Page *et al*., 2008; Menuet *et al*., 2005) (**Figure 13**).

I-3.6 Rôles de l'aromatase au niveau central

Les œstrogènes exercent de multiples effets au niveau cérébral ainsi que le démontrent de très nombreuses études, quelquefois contradictoires. Il n'est pas possible dans le cadre de cette introduction d'en mener l'analyse exhaustive et nous nous limiterons à rappeler les fonctions les mieux documentées sans chercher à entrer dans la mécanistique sous-jacente.

I-3.6.1 Différenciation sexuelle

Chez les mammifères, le rôle le plus connu des œstrogènes produits localement par aromatisation dans le système nerveux central concerne leurs effets organisateurs dans la construction de certaines structures cérébrales sexuellement dimorphiques. Ceci se déroule durant une période critique du développement embryonnaire. Rappelons que chez les

rongeurs, l'activité aromatase cérébrale est maximale durant l'embryogenèse et la période périnatale. En effet, il est admis que l'aromatisation de la T produite par le testicule embryonnaire induit un dimorphisme sexuel irréversible de certaines structures cérébrales comme l'aire préoptique et l'hypothalamus durant cette période critique. Cet effet est confirmé par le fait que des injections sous-cutanées de T ou d'E2 réalisées juste après la naissance induisent une masculinisation irréversible de l'aire préoptique et de l'hypothalamus de rattes génétiquement femelles (Amateau and McCarthy, 2002; McCarthy *et al*., 2002).

Chez certains oiseaux chanteurs, seul le mâle chante, l'aromatisation de la T en E2 permettant la différenciation chez le mâle d'une structure cérébrale spécifique au chant, appelée le « high vocal center » (HVC). En effet, la castration des oiseaux mâles aboutit à un développement incomplet du système de chant, et l'injection de T restaure la différenciation du HVC (Fusani and Gahr, 2006). De plus, l'injection combinée de T avec un inhibiteur d'aromatase, le fadrozole, aboutit à l'établissement d'un chant déstructuré, confirmant donc que l'effet de la T implique une aromatisation.

I-3.6.2 Comportement sexuel

Différentes études ont été menées sur des souris dont l'expression du gène *aromatase* a été abolie (ArKO). La majorité de ces travaux a porté sur l'étude du comportement des animaux déficients en aromatase et donc ne pouvant pas convertir la T en E2. Ces animaux sont ainsi totalement incapables de produire des œstrogènes et sont stériles. Le rôle de l'aromatase dans le comportement sexuel des mâles adultes est bien connu. Une déficience en aromatase entraîne un dysfonctionnement dans les comportements et l'activité sexuelle chez les mâles, ainsi qu'une diminution de la fertilité. De plus, ces déficits sont également accompagnés d'une diminution du comportement agressif envers les autres mâles et de comportements parentaux inhabituels tels que l'infanticide (Matsumoto *et al*., 2003). L'importance du rôle de l'aromatase dans le comportement sexuel des mâles est de plus confirmée par le fait qu'une injection d'E2 sur des mâles ArKO de huit semaines restaure le comportement sexuel des mâles (Bakker *et al*., 2004). Chez les oiseaux, l'aromatase est également connue pour intervenir dans le contrôle du comportement reproducteur, notamment chez la caille. La région préoptique médiane, dans laquelle est fortement exprimée l'aromatase, est très importante dans le comportement reproducteur. En effet, une lésion au niveau de cette région entraîne une diminution du nombre de neurones aromatase-positifs et une déficience du comportement copulateur, des phénomènes qui sont tous deux contrés par une injection de T

dans la région lésée (Balthazart *et al*., 1992b). Ceci suggère que le comportement copulateur des mâles résulte d'une aromatisation de la T, une conclusion renforcée par le fait que l'injection d'un inhibiteur d'aromatase dans cette région diminue significativement le comportement sexuel de mâles castrés traités avec de la T (Balthazart *et al*., 1990; Watson and Adkins-Regan, 1989).

I-3.6.3 Réparation neuronale

Un nombre croissant d'études montre que l'aromatase aurait un rôle potentiel dans la réparation neuronale. En conditions physiologiques, chez les mammifères et les oiseaux, l'aromatase est exprimée dans les neurones. Cependant, après lésion mécanique ou chimique de l'hippocampe chez des rats ou des souris, les astrocytes avoisinant la zone lésée expriment *de novo* l'aromatase (Garcia-Segura *et al*., 1999b). Chez les animaux contrôles, les astrocytes n'expriment pas l'aromatase. D'autres études montrent également qu'une injection de neurotoxine dans l'hippocampe de souris ArKO augmente la perte de neurones par rapport aux souris sauvages. De plus, l'injection de T ou d'E2 dans l'hippocampe de souris sauvages prévient la mort neuronale alors qu'une injection de dihydrotestostérone n'a aucun effet. Enfin, l'injection de T combinée au fadrozole, un inhibiteur d'aromatase, aboutit à une diminution du nombre de neurones confirmant donc que l'effet de la T est dû à sa conversion en E2 par l'aromatase (Azcoitia *et al*., 2001).

Chez les oiseaux, une lésion mécanique cérébrale aboutit également à une expression *de novo* de l'aromatase dans des cellules gliales avoisinant la lésion. De plus, le nombre de cellules en prolifération augmente et ce phénomène se trouve souvent accolé aux prolongements radiaires suggérant un rôle de ces cellules gliales radiaires aromatase-positives dans la réparation neuronale (Peterson *et al*., 2007; Peterson *et al*., 2004).

I-3.6.4 Neuroprotection

Des occlusions artérielles mécaniques provoquées dans le cortex et le striatum de souris femelles ArKO augmentent les dommages neuronaux par rapport aux souris sauvages. De plus, des souris sauvages ayant reçu une injection d'inhibiteur d'aromatase présentent une augmentation du volume de la lésion identique à celle des souris ArKO (McCullough *et al*., 2003). L'injection d'E2 chez les souris ArKO restaure les dommages neuronaux de manière identique aux souris sauvages. Enfin, une occlusion artérielle chez des souris ovariectomisées augmente également les dommages neuronaux, mais ces derniers sont de moindre importance

que ceux observés chez les souris ArKO. Ces résultats suggérent donc qu'une synthèse locale d'E2 dans le cerveau des mammifères est importante pour la neuroprotection (McCullough *et al*., 2003). Une autre étude effectuée sur des rats mâles et femelles gonadectomisés montre qu'une faible dose d'acide kaïnique ne provoque pas de perte neuronale détectable. Cependant, si cette injection est associée à une injection d'inhibiteur d'aromatase, une augmentation de la perte de neurones du gyrus denté de l'hippocampe est observée chez les mâles comme chez les femelles (Veiga *et al*., 2005). Cette étude suggère donc également un effet neuroprotecteur de l'E2, l'E2 qui serait dans ce dernier cas d'origine extragonadale (Veiga *et al*., 2005). *In vitro*, une déprivation d'oxygène-glucose dans le milieu de culture d'astrocytes dérivés de cortex néonatal de rats, résulte en une augmentation de l'activité de l'aromatase dans des cellules issues d'animaux femelles et une diminution de la mort cellulaire par rapport aux cellules issues d'animaux mâles ayant subi le même traitement (Liu *et al*., 2007). Ces données mettent en avant un rôle neuroprotecteur de l'aromatase qui est sexe-spécifique. De même chez les oiseaux, comme le serin, la combinaison de lésions mécaniques avec l'injection d'inhibiteur d'aromatase entraîne une augmentation de la taille de la zone lésée et une augmentation de la mort cellulaire par rapport aux animaux témoins n'ayant subi que la lésion mécanique (Wynne and Saldanha, 2004). Chez les mammifères comme chez les oiseaux, l'E2 issu de la conversion de la T par l'aromatase a donc des effets neurotrophiques et neuroprotecteurs. Cependant les mécanismes sous-jacents à ces rôles de l'E2 sont largement inconnus.

I-3.7 Synthèse des neurostéroïdes

La synthèse locale d'E2 due à la conversion de la T par l'aromatase a été décrite depuis de nombreuses années dans différentes régions du cerveau (Naftolin *et al*., 1971) et chez différentes espèces. Cependant, depuis quelques années, dans le but de comprendre l'origine des stéroïdes précurseurs de l'E2 au niveau central, de plus en plus d'études s'intéressent à l'expression et la régulation des stéroïdes sexuels dans le cerveau. Ces études ont pour but de montrer qu'une synthèse locale complète de stéroïdes appelés ainsi neurostéroïdes est également possible. Ce concept de la synthèse de neurostéroïdes prend pour origine des travaux réalisés par Baulieu et ses collègues, qui montraient que les taux de prégnénolone dans le tissu nerveux étaient plus élevés que les taux circulants (Baulieu, 1997; Baulieu and Robel, 1990). De plus, différentes expériences ont montré qu'après gonadectomie et adrénalectomie, les taux de stéroïdes dans le cerveau sont maintenus, appuyant donc

l'hypothèse d'une synthèse complète de stéroïdes au niveau central (Compagnone and Mellon, 2000).

De nombreuses études sur les neurostéroïdes ont été faites chez les oiseaux chanteurs. Récemment, il a ainsi été montré, chez le serin, par des techniques d'hybridation *in situ* et des mesures de l'activité enzymatique, que toutes les enzymes de la stéroïdogénèse cyp11A1, 3β-HSD, cyp17, aromatase et 17β-HSD sont présentes dans le cerveau du serin au cours du développement (London *et al*., 2006; London and Schlinger, 2007; Schlinger and London, 2006). De plus, ces enzymes sont présentes dans des régions bordant les ventricules cérébraux, notamment télencéphaliques, connues pour être impliquées dans la neurogénèse (voir ci-dessous).

Chez les mammifères, les études cherchant à montrer l'existence d'une synthèse *de novo* de stéroïdes se portent quasi-uniquement sur une région impliquée dans les fonctions cognitives, l'hippocampe. L'expression des enzymes « steroidogenic acute regulatory protein » (StAR), cyp11a1 et la 3β-HSD a été décrite et démontrée par immunohistochimie et Western blot dans l'hippocampe de rat (Furukawa *et al*., 1998; Kimoto *et al*., 2001; Wehrenberg *et al*., 2001). Jusqu'à récemment, la présence et l'activité de l'enzyme cyp17 est restée difficile à montrer. Cependant des dosages enzymatiques, des expériences de PCR en temps réel et d'immunohistochimie, ont permis de détecter cyp17 et cyp19 dans l'hippocampe de rat (Hojo *et al*., 2004) confirmant donc une neurostéroïdogénèse à partir du cholestérol dans l'hippocampe de rat.

Chez les poissons téléostéens, il existe très peu d'informations concernant la stéroïdogénèse dans le cerveau. Excepté pour l'aromatase dont l'expression et l'activité ont été étudiées et décrites chez différentes espèces, les informations restent très fragmentaires concernant l'expression des autres enzymes de la stéroïdogénèse. Il a ainsi été montré par PCR que *cyp17* est exprimée dans le cerveau de poisson zèbre et de la rascasse (Halm *et al*., 2003; Wang and Ge, 2004). La présence de la 3β-HSD dans le cerveau a également été montrée chez le dipneuste africain et le poisson zèbre (Mathieu *et al*., 2001; Sakamoto *et al*., 2001). Plus récemment, il a été démontré, par RT-PCR en temps réel, que toutes les enzymes nécessaires à la synthèse des stéroïdes étaient présentes dans le cerveau du pagre à tête noire et de la truite, dès le début du développement, avec une expression sexuellement dimorphique (Tomy *et al*., 2007).

I-4 E2, ERs et Systeme nerveux central

I-4.1 Généralités

L'E2 intervient dans de nombreuses fonctions au niveau du système nerveux central. Cette hormone est bien sûr importante pour des activités liées à la reproduction, puisqu'elle est notamment impliquée dans les mécanismes du rétrocontrôle gonadique exercé sur les circuits neuroendocriniens et dans certains aspects du comportement sexuel. Cependant, l'E2 intervient également très en dehors de la sphère neuroendocrine, puisqu'on lui reconnaît des actions sur l'humeur, les capacités cognitives ou encore l'activité locomotrice. Les mécanismes sous-tendant ces effets sont pour l'instant mal connus mais, dans de nombreux cas, l'E2 a été montré comme influant la différenciation neuronale, la pousse des épines dendritiques, la synaptogénèse et la neuroprotection. L'ensemble de ces actions de l'E2 au niveau central nécessite la présence des ERs dans les aires cérébrales impliquées dans ces fonctions.

I.4.2 Distributions des ERs dans le cerveau des mammifères

Les premiers résultats montrant l'expression des ERs ont été obtenus après injection *in vivo* d'œstradiol marqué à la thimidine tritiée (Pfaff, 1968a; Pfaff, 1968b). Ces expériences ont permis de mettre en évidence la présence de neurones concentrant l'E2 dans les régions neuroendocrines impliquées dans la reproduction, l'aire préoptique et l'hypothalamus. La caractérisation des ADNc de chaque sous-type d'ER, puis la fabrication d'anticorps spécifiques a permis d'utiliser ensuite des techniques de détection plus sensibles telles que l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie afin d'étudier la distribution cellulaire des ERs. L'hybridation *in situ* avec des ribosondes spécifiques de chacun des ERs a ainsi montré une expression différentielle des ARNm des deux ERs dans différentes régions du cerveau (Shughrue *et al*., 1997). En effet, certaines régions du cerveau expriment seulement l'une des deux formes d'ER, d'autres régions exprimant les deux sous-types. Dans les bulbes olfactifs et le télencéphale, les ARNm ERβ sont détectables, contrairement aux ARNm ERα. Dans l'aire préoptique et les régions antérieures et périventriculaires de l'hypothalamus, les deux ERs sont fortement exprimés, mais ils présentent cependant une expression différentielle. En effet, les messagers ERβ sont détectés principalement dans l'hypothalamus paraventriculaire et le noyau supraoptique, alors que les messagers ERα sont présents essentiellement au niveau du noyau arqué et ventro-médian. Dans l'hippocampe, les messagers ERβ sont plus fortement exprimés que les messagers ERα (Shughrue *et al*., 1997). Enfin, des expériences combinant

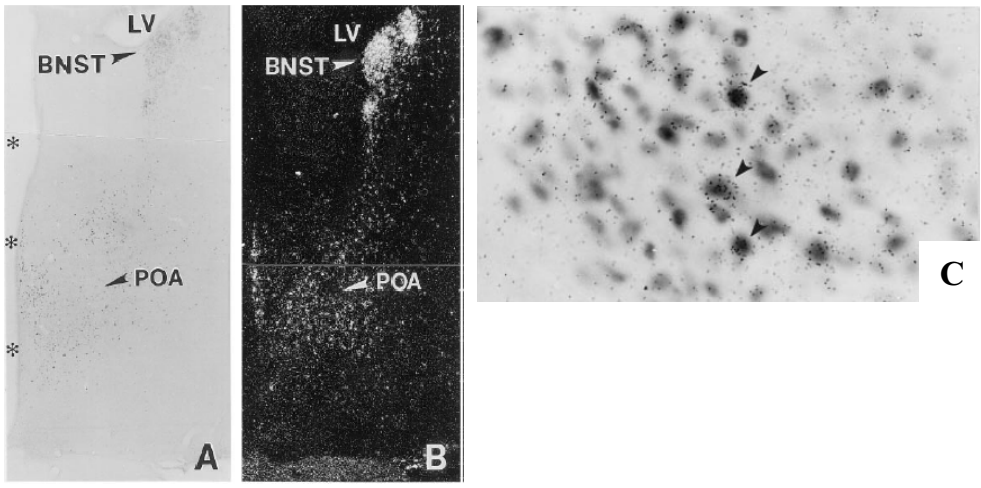


Figure 14 : Les ERs sont exprimés dans les neurones chez les mammifères. D'après Shughrue et al., 1997.
(A et B) Coupes transversale d'aire préoptique médiane de rat représentant la distribution d'ERα (A) par immunohistochimie et d'ERβ (B) par hybridation *in situ.* La topographie du marquage ERα est similaire à celle des messagers ERβ.
(C) Photographie représentant la localisation des messagers ERβ (les grains) et l'immunoréactivité ERα (noyaux foncés) dans les neurones du noyau arqué de cerveau de rat. Les flèches noires indiquent des neurones dans lesquels ERα et ERβ colocalisent.

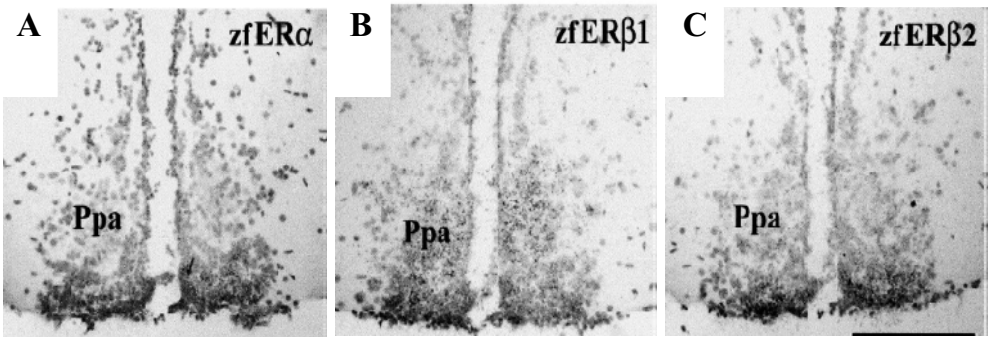


Figure 15 : Distributions des ERs chez le poisson zèbre. D'après Menuet *et al*., 2002. Coupes transversales adjacentes de cerveau adulte de poissons zèbre hybridées avec des sondes spécifiques à chaque sous type d'ER montrant la distribution des messagers de zfERα (A), ERβ1 (B) et ERβ2 (C) dans l'aire préoptique. Une superposition des signaux obtenus avec ces sondes est observée, ainsi que des zones d'expression différentielles.

immunohistochimie et hybridation *in situ* ont montré qu'un grand nombre de neurones exprimait à la fois ERα et ERβ dans différentes régions du cerveau, notamment l'aire préoptique et l'amygdale (Shughrue *et al*., 1998) (**Figure 14**).

Bien que les neurones constituent la principale population de cellules qui expriment ERα, différentes études ont montré que chez le cobaye, le ERα pouvait également être détecté dans des astrocytes de la région préoptique en conditions physiologiques (Langub and Watson, 1992). L'utilisation de la microscopie confocale a également mis en évidence l'expression d'ERβ dans les noyaux, les corps et extensions cellulaires d'astrocytes, notamment dans l'hippocampe (Azcoitia *et al*., 1999). Enfin, après une lésion chimique ou mécanique chez le rat, ERα peut être exprimé *de novo* dans les astrocytes (Garcia-Ovejero *et al*., 2002).

I-4.3 Distributions des ERs dans le cerveau des poissons

Chez le poisson zèbre, les trois formes de zfER sont présentes dans différents tissus comme le foie, les gonades, l'utérus, mais également dans le cerveau et l'hypophyse (Menuet *et al*., 2002). Dans le cerveau, des expériences d'hybridation *in situ* ont permis de décrire la localisation des ARNm de chaque forme de zfERs. Comme chez les mammifères, zfERα, zfERβ1 et zfERβ2 présentent des profils d'expression des messagers distincts, mais avec de nombreuses régions où il existe cependant une superposition (**Figure 15**). Chez le poisson zèbre, les zfERs sont majoritairement présents dans les régions neuroendocrines comme l'aire préoptique et l'hypothalamus. Une expression des zfERs est également décrite dans le tuberculum postérieur (Menuet *et al*., 2002). Chaque zfER est exprimé dans l'aire préoptique (POA), avec cependant quelques différences. En effet, tandis que le zfERα est exprimé seulement dans la région ventrale de la POA, les messagers zfERβ2, bien qu'exprimés dans cette région, sont plus abondants dans la partie dorsale de la POA. Quant aux ARNm zfERβ1, ils présentent une distribution homogène dans la POA. Comme chez les mammifères, certaines cellules peuvent exprimer plusieurs types d'ER (F. Adrio and O. Kah, données non publiées). Au niveau de l'hypothalamus médiobasal, seuls les zfERα et zfERβ2 sont détectés, alors que la forme ERβ1 ne l'est pas. Enfin, au niveau du tubercule postérieur, seuls zfERα et zfERβ1 ont été décrits et l'expression des messagers de zfERβ1 est plus restreinte que celle de zfERα. Bien que présents dans ces trois régions, les ERs semblent plus abondants dans l'aire préoptique que dans les deux autres régions. Cette distribution d'ERα a également été observée chez la truite arc-en-ciel (Menuet *et al*., 2003). Chez le tambour brésilien (Hawkins

et al., 2005) comme chez le poisson zèbre, les messagers des 3 ERs ont été décrits dans les mêmes régions, la POA, l'hypothalamus, le tuberculum postérieur ainsi que dans le cervelet. Bien que présentant des régions de superposition, les profils respectifs d'expression des 3 zfERs présentent des différences en fonction des régions. De plus, même si la distribution des zfERs est similaire dans l'hypothalamus entre le poisson zèbre et le tambour brésilien, il existe des différences au niveau de l'expression des deux formes ERβ dans la POA des cerveaux entre ces deux espèces (Hawkins *et al*., 2005; Menuet *et al*., 2002). Ces différences d'expression entre les différentes formes d'ERs au sein de la même espèce ou encore entre deux espèces différentes, suggèrent d'une part que ces trois récepteurs auraient des fonctions différentes, mais aussi que leur expression pourrait varier avec l'état physiologique des animaux.

I-4.4 Données des knock-out des ERs chez la souris

L'invalidation des 2 sous-types d'ER chez la souris a permis la mise en évidence des rôles de ces récepteurs dans le système nerveux central. Par exemple, une lésion cérébrale hémi-latérale et une ovariectomie chez des souris ERαKO, entraînent des lésions cérébrales plus étendues que chez les souris sauvages. La même expérience réalisée sur des souris ERβKO n'a montré aucun effet. L'effet neuroprotecteur de l'E2 est équivalent à celui observé chez des souris sauvages (Dubal *et al*., 2001). Ces résultats mettent en évidence un rôle différentiel de chacun des deux ERs, et dans ce cas, un rôle majeur d'ERα dans les fonctions neuroprotectrices exercées par l'E2. Cependant, d'autres études portant sur l'invalidation des ERs ont montré que l'invalidation du gène de ERβ conduit à une diminution du nombre de neurones au niveau du cortex cérébral, à une augmentation du nombre d'astrocytes (Wang *et al*., 2001) et provoque une migration anormale des neurones chez ces souris ERβKO en développement (Wang *et al*., 2003a). Ces différentes études laissent à penser que chaque sous-type d'ER aurait des fonctions bien distinctes au niveau du système nerveux central. Le ERα pourrait être impliqué dans les fonctions de neuroprotection et le ERβ dans la mise en place du cerveau lors du développement. L'invalidation du gène ERα a également permis de confirmer que la voie de signalisation œstrogénique joue un rôle dans la différenciation sexuelle de structures cérébrales lors du développement précoce. En effet, le noyau périventriculaire antéroventral de la région préoptique (AVPV) est une structure sexuellement dimorphique, intervenant dans la régulation de la sécrétion de l'hormone lutéïnisante (LH) et nécessaire à l'ovulation. Chez les femelles, le nombre de neurones à dopamine dans cette région est plus élevé que chez les mâles. Or il s'avère que ce nombre est plus élevé chez les

mâles ERαKO que chez les mâles sauvages. Au contraire chez les femelles ERαKO, le nombre de neurones à dopamine dans l'AVPV diminue par rapport aux femelles sauvages mais reste cependant supérieur à celui des mâles ERαKO (Simerly *et al*., 1997). Cette étude met ainsi en évidence que la différenciation des neurones à dopamine dans l'AVPV semble être ERα-spécifique et dépendant de l'environnement stéroïdien (Simerly *et al*., 1997). Ces dernières données, ainsi que d'autres travaux, suggèrent donc un lien possible entre aromatase, œstrogènes et neurogénèse.

II-NEUROGENESE

II-1 GENERALITES

Pendant plus d'un siècle, la neurogénèse adulte a été considérée comme étant impossible. En effet, le dogme scientifique selon lequel « nous sommes nés avec un certain nombre de neurones qui diminuent avec l'âge et qu'aucune activité neurogénique après la naissance n'est possible » (Ramon y Cajal, 1902) a écarté toute recherche scientifique. Bien que des travaux pionniers aient suggéré, dès les années 60-70, l'existence d'une prolifération cellulaire, ce n'est que depuis une dizaine d'années que ce dogme s'est totalement effondré et que la notion de neurogénèse adulte est admise par la communauté scientifique. L'émergence de nouvelles techniques, telles que le traitement à la 2-déoxy-bromouridine (BrdU) permettant de suivre le devenir de cellules s'étant divisées, a joué un rôle majeur dans ces évolutions. Cette méthode a permis de montrer l'existence d'une neurogénèse adulte dans le cerveau de tous les vertébrés avec cependant des différences notables d'un groupe évolutif à l'autre. Cette activité neurogénique adulte se produit en effet dans des régions limitées chez les mammifères et les oiseaux, mais concerne l'ensemble du cerveau chez les poissons. La description des mécanismes sous-tendant la neurogénèse adulte pouvant conduire à une meilleure compréhension des processus favorisant l'apparition de maladies neurodégénératives et au développement de nouvelles perspectives thérapeutiques, d'intenses recherches ont alors été réalisées pour découvrir la nature des cellules souches neuronales et les mécanismes de maintenance, d'activation et de différenciation de telles cellules. Petit à petit, le rôle prépondérant des cellules gliales radiaires dans ces processus fut alors suggéré.

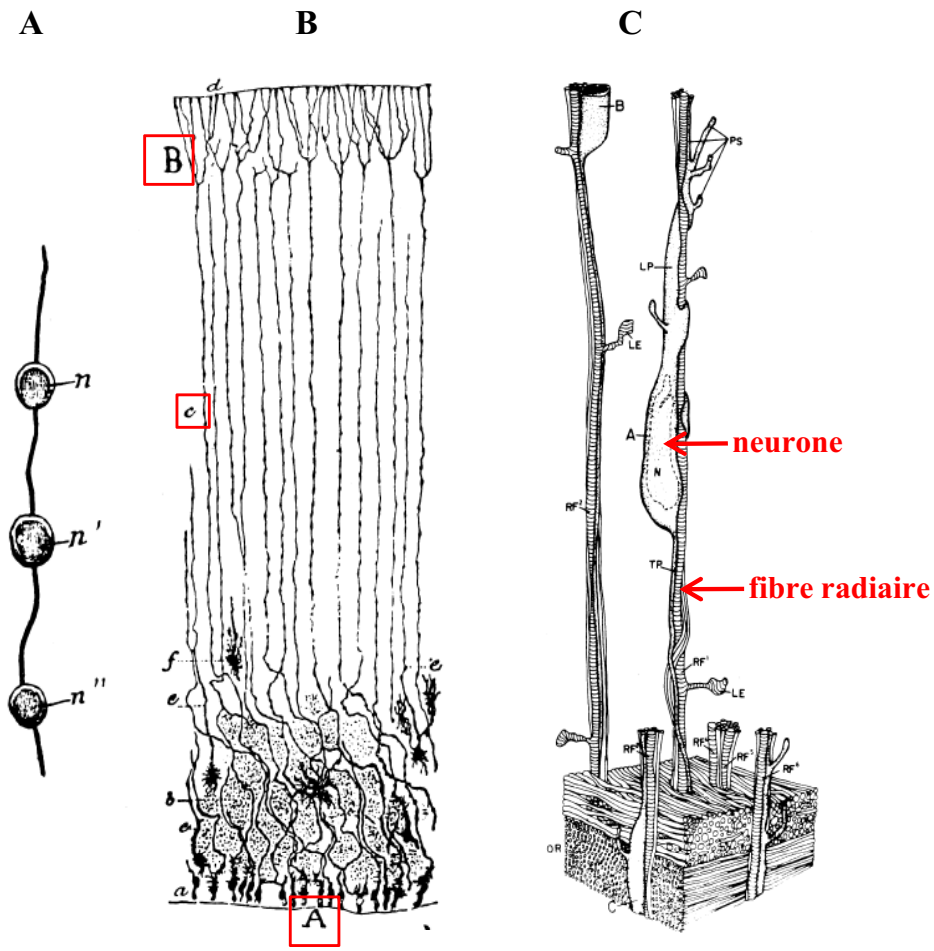


Figure 16 : **Historique de la description des cellules gliales radiaires et de leur relation avec les neurones.** D'après Bentivoglio et Mazarello, 1999.
(A) Dessin de Magini après observation de cellules d'un cerveau de fœtus avec la technique d'imprégnation de Golgi, schématisant trois noyaux (notés n, n', n'') entourés de fin cytoplasme et « insérés » le long d'un filament.
(B) Dessin de glie radiaire par Ramon y Cajal représentant des cellules épithéliales et neurogliales d'un cortex cérébral de lapin de quelques jours. Légende correspondante (entourée en rouge) : A : corps cellulaires des cellules épithéliales B : arborisations de ces cellules, c: fibres radiaires.
(C) Reconstruction tri-dimensionnelle illustrant les relations existant entre les fibres radiaires et les neurones migrant le long de ces fibres dans un cortex de primate.

II-2 LES CELLULES GLIALES RADIAIRES

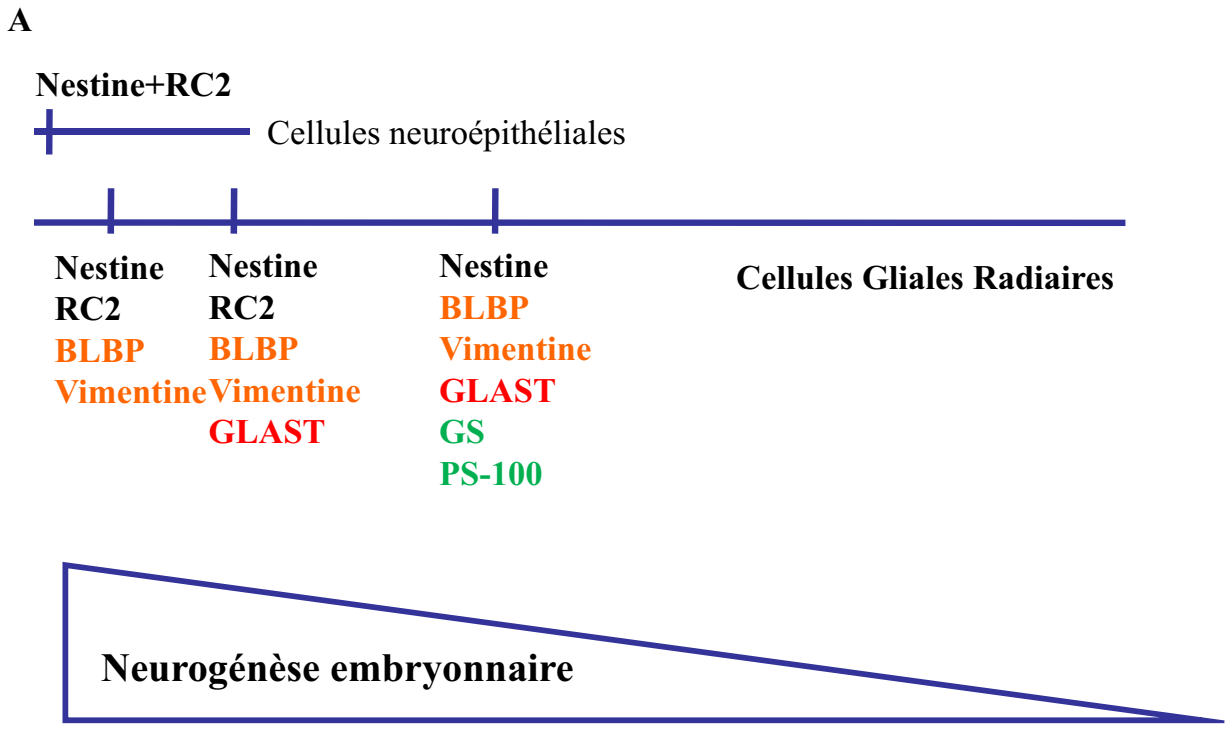
II-2.1 Historique

La découverte et la description des cellules gliales radiaires ont commencé il y a plus d'un siècle. La technique de Golgi d'imprégnation au nitrate d'argent a joué un rôle crucial dans la détection de ces cellules gliales radiaires. En effet, en 1873, grâce à cette méthode, Camillo Golgi fut le premier à décrire ces cellules dans la moelle épinière chez l'embryon. En 1887, Magini confirma les observations de Golgi en étudiant le cortex cérébral de différents mammifères et fut le premier à nommer ces cellules, cellules radiaires. De plus, Magini fut l'un des premiers histologistes à décrire un autre type cellulaire avoisinant les cellules radiaires et suggérant que ces cellules pouvaient être des neuroblastes. Magini fut également l'un des premiers à remarquer que les cellules gliales radiaires n'étaient pas présentes chez les adultes. En 1888, Santiago Ramon y Cajal confirmèrent également les observations de Golgi et de Magini sur des embryons de poulet et notèrent également l'absence de ce type de cellules chez les adultes. Quelques années plus tard, Cajal puis His suggérèrent que les cellules gliales radiaires pourraient servir de support de migration aux neuroblastes. Suite à ces travaux des pionniers de la neurobiologie, les cellules radiaires furent négligées pendant de longues décennies. En 1950, le développement de la microscopie électronique et des techniques d'autoradiographie à la thymidine tritiée a permis la reprise de ces travaux, et le terme de glie radiaire apparut alors (pour revue : Bentivoglio and Mazzarello, 1999). En 1972, en combinant microscopie et méthode de Golgi, Rakic identifia et décrivit les cellules gliales radiaires lors de l'étude des phases initiales de l'histogénèse du cerveau (**Figure 16**). Le rôle des cellules gliales radiaires dans le développement du système nerveux central tel qu'il est actuellement reconnu chez tous les vertébrés émergea alors (Rakic, 2003).

II-2.2 Définition et caractéristiques

Les cellules gliales radiaires, comme leur nom l'indique, appartiennent classiquement à la catégorie des cellules gliales, par opposition aux neurones. Les cellules gliales se divisent elles-mêmes en deux groupes, la microglie, « les macrophages du cerveau », et la macroglie qui elle-même regroupe les cellules gliales radiaires, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules épendymaires.

Les cellules gliales radiaires sont bien caractérisées en raison de leur morphologie particulière et de leurs caractéristiques « gliales ». Ce sont des cellules non neuronales



B

Début : 3 principales sous-populations de cellules gliales radiaires

1: RC2+ BLBP

2: RC2+ GLAST

3: RC2+ GLAST+ BLBP

Fin : 2 principales sous-populations de cellules gliales radiaires

1: RC2+ GLAST+ BLBP

2: BLBP+GLAST

Figure 17 : Marqueurs de cellules gliales radiaires.
(A) Illustration schématique de l'ordre d'apparition des marqueurs des cellules gliales radiaires durant le développement embryonnaire. RC2: forme post-traductionnelle de la Nestine; BLBP: « brain lipid binding protein »; GLAST: un transporteur au L-glutamate et L-aspartate; GS: « glutamine synthase »; PS-100: sous-unité β de la protéine S100, protéine de liaison au calcium.
(B) Illustration des principales sous-populations de cellules gliales radiaires au cours du développement. Trois sous-populations sont observées au début de la neurogenèse. A la fin de la neurogenèse embryonnaire, une seule de ces trois populations est présente tandis qu'une nouvelle apparaît (BLBP+GLAST).

dérivées des cellules neuroépithéliales issues du développement du tube neural. Bien qu'elles aient la même morphologie que les cellules épithéliales dont elles dérivent, elles sont différentes de ces dernières de par leurs propriétés gliales et l'expression spécifique de marqueurs astrogliaux (Gotz and Huttner, 2005). D'un point de vue morphologique, le noyau de ces cellules est de forme ovale et le corps cellulaire est positionné en bordure de ventricule. De plus, ces cellules possèdent des extensions bipolaires avec un prolongement cytoplasmique court accolé au ventricule et un prolongement cytoplasmique long traversant le parenchyme cérébral qui se termine en une structure appelée « pied » à la périphérie du cerveau (Gotz and Barde, 2005; Rakic, 2003). En outre, les cellules gliales radiaires ont des caractéristiques communes avec les astrocytes, un autre type de cellules gliales. En effet, comme les astrocytes, les cellules gliales radiaires contiennent des granules de glycogène et partagent des caractéristiques ultrastructurales. Enfin, les cellules gliales radiaires et les astrocytes expriment des marqueurs spécifiques dont certains sont communs, mais qui peuvent toutefois varier selon l'espèce et la région cérébrale.

II-2.3 Marqueurs de cellules gliales radiaires

II-2.3.1 Chez les mammifères

L'expression de différents marqueurs de cellules gliales radiaires a été particulièrement étudiée durant le développement chez les mammifères (**Figure 17**). Ces cellules expriment une variété de molécules qui sont également caractéristiques des astrocytes. En effet, ces deux types cellulaires expriment un transporteur au L-glutamate et L-aspartate spécifique des astrocytes (GLAST) (Hartfuss *et al*., 2001), la glutamine synthase (GS) (Akimoto *et al*., 1993), la sous-unité β de la protéine S100 qui est une protéine de liaison au calcium. Ces cellules expriment également la « glial fibrillary acidic protein » (GFAP), qui n'est cependant pas exprimée dans les cellules gliales radiaires des rongeurs (Sancho-Tello *et al*., 1995), la tenascine, une molécule de la matrice extracellulaire (Gotz *et al*., 1998), la vimentine, une protéine des filaments intermédiaires (Schnitzer *et al*., 1981) et la « brain lipid binding protein » (BLBP), qui est une protéine de transport des acides gras (Anthony *et al*., 2004). En fait, si aucune de ces molécules n'est spécifique aux cellules gliales radiaires et aux astrocytes, c'est la combinaison de ces différents marqueurs associée à la morphologie particulière de ces cellules qui les caractérise. Il est également important de préciser que les cellules gliales radiaires n'expriment pas tous ces marqueurs au même moment, mais qu'il

existe une hétérogénéité dans l'expression de ces molécules en fonction des régions et du stade de développement.

En effet, tandis que les cellules neuroépithéliales expriment la nestine et RC2, une forme de la nestine présentant certaines modifications post-traductionnelles, l'apparition des cellules gliales radiaires se caractérise tout d'abord par l'expression de la nestine, mais également de la BLBP et de la vimentine dans le cortex cérébral. Ceci va ainsi permettre de faire la distinction entre les cellules neuroépithéliales et les cellules gliales radiaires (Anthony *et al*., 2004; Malatesta *et al*., 2003). L'expression de GLAST suit de très peu celle de la BLBP et de la vimentine (Malatesta *et al*., 2003). La GS et la protéine S100β sont détectables plus tard dans le télencéphale de souris. Il est également important de souligner que l'apparition précoce de ces molécules dans les cellules gliales radiaires a lieu dans l'éminence ganglionique latérale qui est à l'origine de la zone sous-ventriculaire et décrite comme une des deux régions d'activité neurogénique chez les adultes (Mori *et al*., 2005). De plus, la combinaison de l'expression de ces différents marqueurs a également permis de mettre en évidence la destinée des cellules nouvellement générées, différente et particulière selon l'expression des marqueurs dans les cellules gliales radiaires. Au début de la neurogénèse, il existe principalement trois sous-populations de cellules gliales radiaires, une population exprimant RC2 et BLBP, une deuxième exprimant RC2 et GLAST et une troisième exprimant RC2/GLAST/BLBP. A la fin de la neurogénèse, seule la sous-population RC2/GLAST/BLBP subsiste et une nouvelle sous-population BLBP/GLAST apparaît (Hartfuss *et al*., 2001), suggérant ainsi l'importance de l'expression d'un marqueur comme BLBP et suggérant également la bipotentialité de ces précurseurs.

II-2.3.2 Chez les poissons

L'expression de marqueurs spécifiques des cellules gliales radiaires est beaucoup moins documentée chez les poissons téléostéens que chez les mammifères, en raison de l'intérêt seulement récent porté à ces cellules et de l'absence d'anticorps spécifiques. En effet, les différentes études portant sur plusieurs espèces de poissons ont montré que l'expression de ces marqueurs diffère selon l'espèce et le stade embryonnaire, juvénile ou adulte. Ainsi, alors que chez la truite juvénile, Frojdo *et al*. (2002) ont montré, *in vitro*, que la GFAP est exprimée dans des astrocytes, chez les truites adultes, des cellules présentant une morphologie de type cellule gliale radiaire ont été caractérisées comme étant GFAP-positives (Alunni *et al*., 2005). Ces cellules présentent de plus une coexpression GFAP/vimentine, un autre marqueur de

cellules gliales (Alunni *et al*., 2005). Chez le mulet gris, des expériences d'immunohistochimie ont permis la mise en évidence de deux populations de cellules coexprimant la GFAP et la vimentine des cellules gliales radiaires et des tanycytes, ces deux populations différant en fonction des régions observées. De plus, une diminution de l'expression de la vimentine et une augmentation de l'expression de la GFAP ont été observées au cours du développement (Arochena *et al*., 2004). Enfin, une lignée de poisson zèbre transgénique GFAP/GFP (« Green Fluorescent Protein ») a confirmé l'expression de la GFAP exclusivement dans les cellules gliales radiaires et jamais dans les neurones (Bernardos and Raymond, 2006). Chez la truite arc-en-ciel adulte, Pellegrini *et al*. (2005) ont montré que la protéine S100β est exprimée dans des cellules gliales radiaires. Chez le poisson zèbre, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine S100 ou la GFAP n'a pas permis de caractériser parfaitement les cellules gliales radiaires.

II-2.3.3 L'aromatase, un marqueur inattendu des cellules gliales radiaires

Chez le poisson crapaud, l'aromatase a été décrite pour la première fois dans des cellules gliales radiaires et il a été fortement suggéré que les neurones n'exprimaient pas ce marqueur chez les poissons (Forlano *et al*., 2001). Ces résultats extrêmement surprenants à l'époque ont par la suite été confirmés chez plusieurs espèces, notamment la truite et le poisson zèbre. Chez cette dernière espèce, un anticorps spécifique de l'aromatase B de poisson zèbre a permis de mettre en évidence la distribution des cellules gliales radiaires dans tout le cerveau antérieur de poisson zèbre (Menuet *et al*., 2005). Ces cellules aromatase-positives ont la morphologie caractéristique des cellules gliales radiaires et sont présentes aussi bien chez l'adulte que pendant le développement embryonnaire dans le cerveau antérieur de poisson zèbre principalement dans le télencéphale, l'aire préoptique et l'hypothalamus. Néanmoins, des cellules positives sont également présentes dans les toits optiques et le tronc cérébral mais en moins grand nombre.

II-3 ROLES DES CELLULES GLIALES RADIAIRES

II-3.1 Support de migration pour les neurones

En plus d'être bien caractérisées par leur morphologie et par l'expression spécifique de différents marqueurs, les cellules gliales radiaires sont connues depuis longtemps pour leur rôle majeur dans la neurogénèse embryonnaire. En effet, la fonction première reconnue de ces cellules est d'intervenir dans la migration des neurones en cours de différenciation. Les

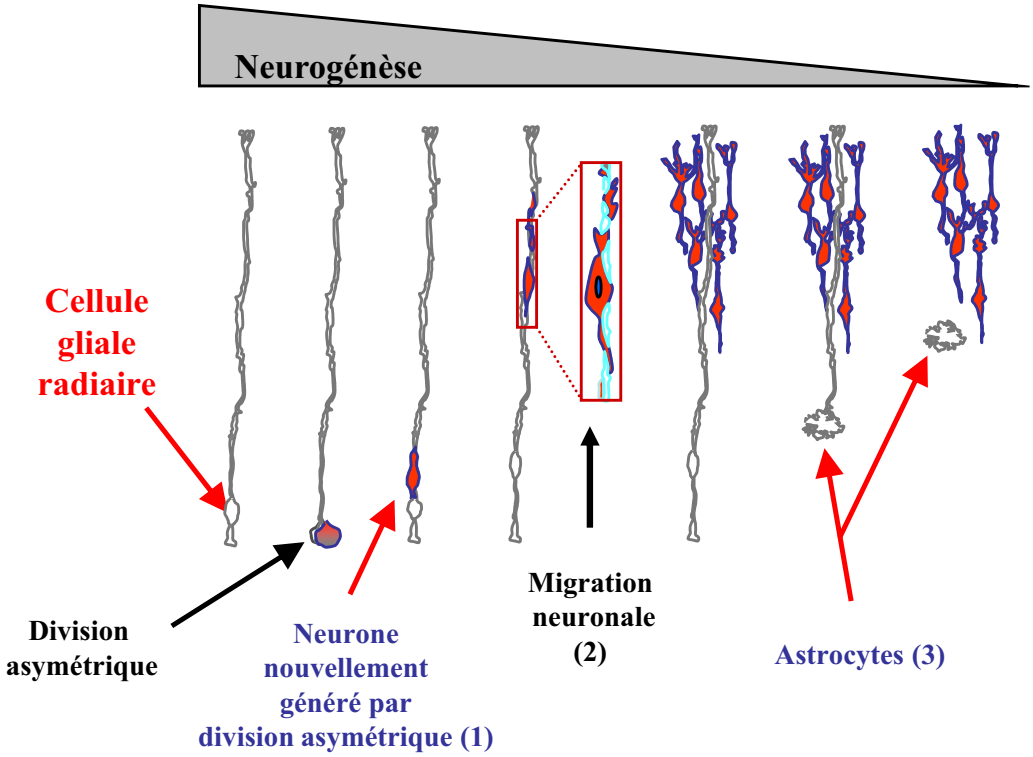


Figure 18 : Schéma représentant le rôle des cellules gliales radiaires pendant la neurogenèse embryonnaire du cortex de souris. D'après Noctor *et al*., 2002. Les cellules gliales radiaires génèrent par division asymétrique des neurones (1) qui utilisent alors les prolongements des cellules gliales radiaires (2) pour migrer vers leur localisation finale. A la fin de la neurogenèse, les prolongements se rétractent et les cellules gliales radiaires se différencient alors en astrocytes (3).

neurones nouvellement générés dans le cortex cérébral chez les mammifères ne sont pas générés dans le cortex lui-même, mais naissent à proximité des ventricules et migrent vers la zone sous-ventriculaire en utilisant les prolongements radiaires comme support de migration afin de gagner leur destination finale (Rakic, 2003). La morphologie des cellules gliales radiaires permet aux neurones de coloniser différentes régions cérébrales dans la mesure où les très longs prolongements radiaires (jusqu'à plusieurs millimètres chez le singe) sont attachés à la surface du cerveau, permettant ainsi de guider les neurones (Hatten, 1999). L'utilisation et l'émergence de nouvelles techniques et de marqueurs moléculaires ont ainsi permis de confirmer ce rôle de support de migration des nouveaux neurones, mais également de mettre en évidence la présence de molécules de surface (neuréguline, intégrines) présentes dans les neurones post-mitotiques et permettant la reconnaissance et l'adhésion à la surface adjacente des fibres radiaires (Hatten, 2002; Rakic, 2003).

II-3.2 Cellules progénitrices neuronales

II-3.2.1 Pendant le développement embryonnaire

Pendant de nombreuses années, la fonction des cellules gliales radiaires demeura restreinte à la migration neuronale. En effet, la morphologie si particulière de ces cellules si hautement différenciées avec deux processus, dont l'un traversait le parenchyme cérébral pour « s'attacher » à la surface du cerveau, faisait douter de leur capacité à se diviser. Cependant, au début des années 2000, différentes études réalisées chez les mammifères ont remis en cause l'unique fonction des cellules gliales radiaires comme support de migration et ont émis l'hypothèse que les cellules gliales radiaires et les cellules progénitrices neurales sont une même population (Malatesta *et al*., 2000; Noctor *et al*., 2001).

Plusieurs travaux ont permis de démontrer clairement que les cellules gliales radiaires sont des cellules progénitrices neuronales qui, par division asymétrique, génèrent des neurones qui vont migrer le long des prolongements radiaires (**Figure 18**). A la fin de la neurogénèse, les prolongements radiaires se rétractent et les cellules se différencient en astrocytes (Noctor *et al*., 2002). Par exemple, des expériences, après infection par un rétrovirus couplé à la séquence codante la GFP, ont montré qu'après 24h d'infection, la majorité des cellules infectées semblaient être des cellules gliales radiaires. A des temps plus tardifs (36h, 48h et 72h), des cellules gliales radiaires infectées par le rétrovirus sont toujours observées mais des neurones migrant le long des prolongements radiaires sont alors également observés. De plus, après injection de BrdU, un analogue de la thymidine qui

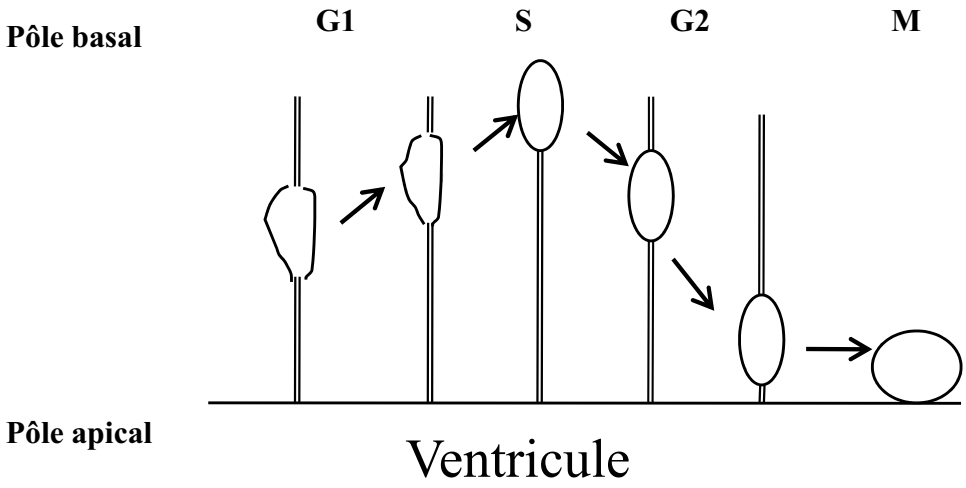


Figure 19 : **Illustration du processus de migration nucléaire interkinétique**. D'après Chenn et McConnell, 1995. Le noyau des cellules accolées au ventricule migre de manière intracellulaire durant le cycle cellulaire. En phase G1, le noyau s'éloigne de la surface apicale (coté ventricule). En phase S, le noyau est alors en position basale loin de la zone ventriculaire. Durant la phase G2, le noyau est transloqué apicalement et la mitose a lieu au niveau du ventricule.

s'incorpore pendant la phase S, seules les cellules GFP-positives correspondant à des cellules gliales radiaires ont incorporé la BrdU, suggérant donc que seules les cellules gliales radiaires ont la potentialité de constituer des cellules progénitrices. Afin d'approfondir cette étude, Noctor *et al*. (2002) ont réalisé des marquages immunohistochimiques en combinant BrdU et des marqueurs de cellules gliales radiaires comme la vimentine et RC2 et démontré ainsi que la majorité voire la totalité des cellules en phase S (BrdU positives) présentes dans la zone ventriculaire (VZ) sont positives pour la vimentine. Des résultats quasi identiques avec RC2 ont confirmé ces résultats. Puis, des expériences similaires alors réalisées avec deux autres marqueurs de cellules gliales radiaires, la BLBP et GLAST, ont confirmé une fois de plus, que les cellules en phase S dans la VZ embryonnaire correspondaient à des cellules gliales radiaires exprimant différents types de marqueurs. Enfin, afin de montrer définitivement le potentiel progéniteur de ces cellules gliales radiaires, les auteurs ont réalisé des marquages immunohistochimiques avec un marqueur appelé 4A4 reconnu pour être un marqueur de cellules gliales radiaires en division. En effet, la vimentine est phosphorylée par une kinase du cycle cellulaire (la « cell division cycle 2 », cdc2) pendant la division cellulaire dans les cellules gliales radiaires en phase M. L'expression de 4A4 est exclusivement détectée dans les cellules gliales radiaires dans la VZ (Noctor *et al*., 2002). De plus, ces cellules sont positionnées en bordure de ventricule suggérant donc une division de ces dernières faisant intervenir un processus appelé migration nucléaire interkinétique. En effet, les cellules en phase M se retrouvent toujours en bordure de ventricule après avoir effectué leur phase de réplication de l'ADN en position plus basale. Ces réplications de l'ADN en position plus basale ont été démontrées par des doubles marquages BrdU/vimentine. Or, les cellules progénitrices sont connues pour intervenir dans un processus particulier: le mouvement nucléaire interkinétique. La migration nucléaire interkinétique est un processus qui dépend de la phase du cycle cellulaire (**Figure 19**). En effet, lors de la phase S du cycle cellulaire, le noyau migre vers la membrane basale, puis revient à sa position d'origine, vers la zone ventriculaire lors de la phase M (Gotz and Huttner, 2005). Les études menées sur la migration nucléaire interkinétique suggèrent que ce sont les cellules souches qui sont caractérisées par ce processus. En effet, chez les embryons de rongeurs, les cellules souches répliquent leur ADN dans une couche plus profonde que la zone ventriculaire puis leur noyau retourne à sa position originelle, la lumière ventriculaire, et la cellule se divise (Chenn and McConnell, 1995). Cependant, la régulation de ce mécanisme et sa signification biologique restent peu comprises. Une hypothèse serait que cette migration nucléaire interkinétique permettrait une ségrégation de la zone ventriculaire en deux régions (la zone apicale et la zone basale). La

zone apicale et la zone basale favoriseraient ainsi respectivement la neurogénèse et la réplication de l'ADN pour permettre la génération d'un nombre important de neurones et de cellules gliales à un temps donné (Ueno *et al*., 2006).

Les cellules gliales radiaires sont donc des cellules progénitrices neuronales pendant le développement embryonnaire. Ces résultats ont été confirmés par plusieurs études utilisant différentes techniques. Des études utilisant un rétrovirus ont montré que les cellules gliales radiaires constituent la majorité voire la totalité des cellules progénitrices neuronales dans le cortex cérébral pendant le développement (Hartfuss *et al*., 2001; Noctor *et al*., 2004). *In vitro*, l'isolation de cellules gliales radiaires par cytométrie en flux a confirmé que les cellules progénitrices neuronales sont majoritairement des cellules gliales radiaires (Malatesta *et al*., 2003; Malatesta *et al*., 2000). En effet, des souris transgéniques GFAP-GFP ont été générées et leurs cellules gliales radiaires GFP-positives isolées par cytométrie en flux puis mises en culture afin d'étudier leur progéniture. Ces travaux ont montré que 60 à 70% des cellules gliales radiaires isolées génèrent seulement des neurones, d'autres génèrent uniquement des cellules gliales radiaires, enfin, une dernière partie de ces cellules donne naissance à la fois à des neurones et à des cellules gliales comme les astrocytes ou oligodendrocytes.

II-3.2.2 Neurogénèse adulte

Pendant un siècle, le cerveau adulte a été considéré comme incapable de générer de nouveaux neurones. L'hypothèse étant qu'à la fin de la neurogénèse embryonnaire, l'être vivant avait un stock de neurones jusqu'à la fin de sa vie et qu'en aucun cas, une neurogénèse adulte ne pouvait exister. Aussi à la fin des années 1960, des doutes sont apparus quant à ce dogme scientifique établi depuis de nombreuses années et qui s'est effondré au milieu des années 1990. Le manque de connaissance sur les lésions et les maladies neurodégénératives, la difficulté de trouver de l'activité neurogénique dans différentes régions du cerveau adulte avaient abouti à la conclusion que la neurogénèse ne pouvait avoir lieu dans le cerveau adulte. Joseph Altman a été le premier à utiliser des techniques assez sensibles pour pouvoir détecter des cellules en division dans le cerveau adulte. En effet, en utilisant de la thymidine tritiée comme marqueur mitotique, il a été le premier à mettre en évidence, des cellules en prolifération dans l'hippocampe (Altman and Das, 1965) et dans les bulbes olfactifs (Altman, 1969) du cerveau adulte de mammifères. Ces résultats ont ensuite été confirmés en combinant thymidine tritiée et microscopie électronique (Kaplan, 1981). Cependant, du fait du manque de marqueurs immunohistochimiques de neurones à cette époque, l'identification de

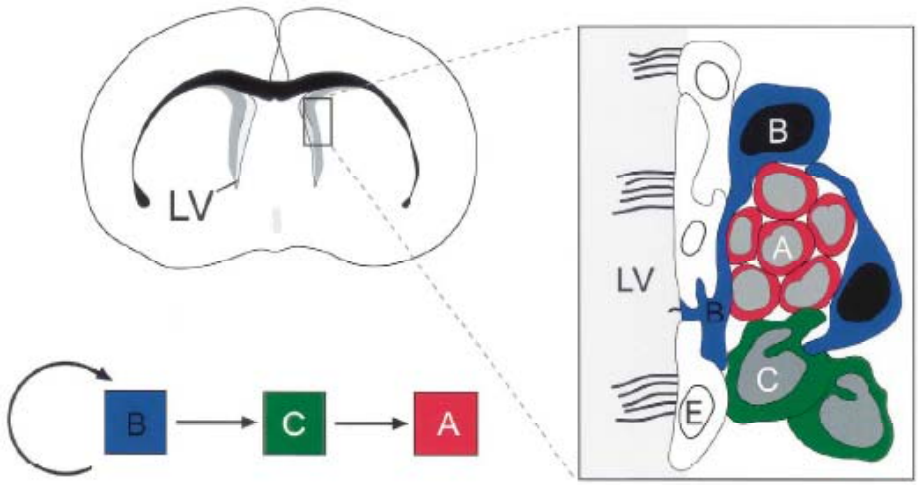


Figure 20 : Processus de neurogenèse adulte au sein de la zone sous-ventriculaire (SVZ). D'après Alvarez-Buylla *et al,*. 2002. Coupe transversale de cerveau adulte de souris (à gauche) et schéma de la composition et de l'architecture de la SVZ des ventricules latéraux (LV) durant les processus de neurogénèse chez l'adulte (à droite). Les astrocytes de la SVZ (cellules B, dérivant de la glie radiaire) se divisent pour donner des précurseurs (cellules C), lesquels vont rapidement générer des neuroblastes (cellules A). Ces derniers migrent ensuite jusqu'aux bulbes olfactifs. Les cellules notées E sont des cellules épendymaires .

nouveaux neurones n'était basée que sur la morphologie des cellules. Aussi, l'étude d'une apparente neurogénèse adulte n'a pu être approfondie qu'avec l'émergence de nouvelles techniques (BrdU) et également de marqueurs immunohistochimiques permettant la caractérisation et l'identification des cellules. Les toutes premières études sur la neurogénèse adulte se sont intéressées à définir les régions dans lesquelles il existe effectivement une activité proliféatrice. Puis, la question qui s'est posée alors était de savoir quelle était la nature des cellules progénitrices dans le cerveau adulte.

II-3.2.2a Neurogénèse adulte chez les mammifères

Chez les mammifères adultes, seules deux régions ont été décrites jusqu'à présent comme ayant une activité neurogénique : la zone sous ventriculaire (SVZ) et la zone sous granulaire (SGZ). La SVZ correspond à la région située entre les murs des ventricules latéraux. Dans cette région, de nouveaux neurones sont produits et migrent le long du RMS (« rostral migratory stream ») pour atteindre les bulbes olfactifs et se différencier en interneurones granulaires ou périglomérulaires (Doetsch *et al*., 1999). Dans le gyrus denté de l'hippocampe, une activité neurogénique a également été décrite au niveau de la SGZ du gyrus denté. Dans cette région, sont produits les nouveaux neurones granulaires de l'hippocampe. Après la découverte de régions à activité neurogénique chez les mammifères adultes, différentes études se sont intéressées à la nature des cellules progénitrices dans le cerveau adulte. En effet, dans le cerveau adulte de mammifères, il n'y a pas de cellules gliales radiaires, celles-ci ayant régressé à la fin de la neurogénèse embryonnaire, aussi l'identité des cellules progénitrices neuronales chez l'adulte est intrigante.

II-3.2.2a1 La zone sous-ventriculaire (SVZ)

Chez l'adulte, des cellules possédant des caractéristiques de cellules progénitrices (capables de se diviser et multipotentes) peuvent être isolées de la SVZ. Leur mise en culture en présence d'« epidermal growth factor » EGF et de « fibroblast growth factor » FGF donne naissance à des neurones. La composition et l'organisation cellulaire de la SVZ a été alors décrite (**Figure 20**) (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002; Alvarez-Buylla *et al*., 2002). Quatre types cellulaires différents sont caractérisés: les cellules de type A correspondent à des neuroblastes qui ont été observés migrant le long du RMS ; les cellules de type B ont été caractérisées comme ayant un cycle de division lent et ayant des caractéristiques astrocytaires. En effet, ces cellules de type B sont immunoréactives à la GFAP, possèdent des granules de glycogène, des « gaps jonctions » et des filaments intermédiaires. Un autre type de cellules a

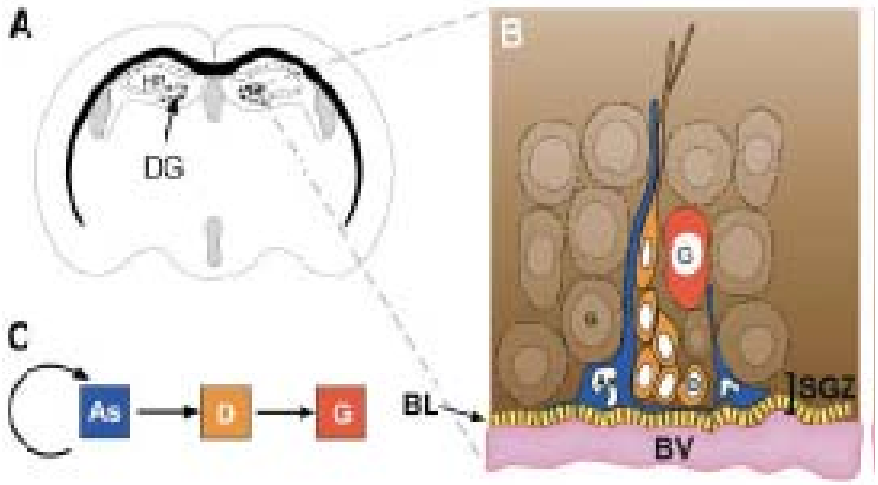


Figure 21 : Neurogenèse adulte au sein de la zone subgranulaire (SGZ) du gyrus dentelé de l'hippocampe. D'après Alvarez-Buylla et Lim, 2004.
(A) Coupe transversale de cerveau adulte de souris au niveau de l'hippocampe. Le gyrus dentelé de l'hippocampe est indiqué par la flèche et noté DG.
(B et C) Schéma des processus de neurogénèse au niveau de la SGZ. Les astrocytes (As, en bleu) génèrent des cellules progénitrices intermédiaires (D, en orange) qui vont se différencier en neurones granulaires (G, en rouge). Ces nouveaux neurones colonisent alors la couche granulaire (G, en marron). BV : vaisseaux sanguins, en rose; BL: lame basale.

été identifié, appelé type C et ayant la caractéristique de se diviser rapidement contrairement au type B. Enfin, le dernier type cellulaire identifié, appelé type E, correspond à des cellules épendymales. Afin de tester l'hypothèse que le type B astrocytaire correspond aux cellules progénitrices, un antimitotique a été injecté à des souris ; seules quelques cellules type B et E subsistent tandis que les types C et A disparaissent. Vingt-quatre heures après l'injection de l'anti-mitotique, les astrocytes de la SVZ commencent à se diviser et génèrent alors des cellules de type C qui donnent les neuroblastes. Après 10 jours, la SVZ est entièrement régénérée. De plus, aucune cellule épendymaire n'incorpore le marqueur mitotique confirmant donc que ces cellules ne sont pas les cellules progénitrices neuronales. Ce sont donc les astrocytes (type B) qui sont les cellules progénitrices de la SVZ.

II-3.2.2a2 La zone sous-granulaire (SGZ)

Contrairement à la SVZ, la SGZ n'est pas positionnée en bordure de ventricule mais plus profondément dans le cerveau à l'interface de la couche cellulaire granulaire entre le gyrus denté et l'hilus de l'hippocampe. Des études réalisées *in vitro* ont tout d'abord montré qu'il existe des cellules souches dans cette région. Cependant, leur localisation et leur identité n'étaient pas démontrées. Après la découverte des astrocytes comme cellules progénitrices dans la SVZ, la même hypothèse a été testée dans la SGZ (Alvarez-Buylla *et al*., 2002) (**Figure 21**). Avec des marqueurs d'astrocytes et l'appui de la microscopie électronique, des astrocytes ont également été décrits dans la SGZ. Ensuite, l'utilisation de différents marqueurs de prolifération (BrdU et thymidine tritiée) a permis de montrer que 80 % des cellules en division correspondent à des astrocytes. Le nombre d'astrocytes ayant incorporé un marqueur de division diminue rapidement au profit de petites cellules appelées « dark cells » ou type D. L'utilisation d'un anti-mitotique comme dans la SVZ aboutit à la disparition de nombreuses cellules D et astrocytes. Cependant quelques astrocytes survivent et, 4 jours après le traitement, les cellules de type D réapparaissent. Plus tard, de nouveaux neurones apparaissent également, montrant que les astrocytes sont des cellules progénitrices dans le cerveau adulte et qu'elles génèrent des cellules des neurones granulaires *via* un autre type de cellules, les cellules de type D (Alvarez-Buylla *et al*., 2002).

Après avoir démontré que, dans le cerveau adulte, les astrocytes de la SGZ sont les cellules progénitrices neuronales, l'hypothèse était de savoir si ces astrocytes dérivaient des cellules gliales radiaires avant leur régression à la fin de la neurogénèse embryonnaire. De plus, les astrocytes qui, à l'âge adulte, ont un potentiel de cellules progénitrices peuvent-ils

être générés juste avant la disparition des cellules gliales radiaires ? Une étude a été réalisée sur des souris à différents stades de développement embryonnaire et des adultes, afin de tester cette hypothèse. Tout d'abord, en suivant des marqueurs de cellules gliales radiaires et d'astrocytes, ces travaux ont mis en évidence que l'apparition des astrocytes matures correspond au moment où les cellules gliales radiaires disparaissent, *i.e.* à la fin de la neurogénèse embryonnaire (Merkle *et al*., 2004). Dans les premiers stades de développement, seules les cellules gliales radiaires sont marquées suivant l'injection d'un rétrovirus marquant les cellules en division. Si ces cellules gliales radiaires marquées par le rétrovirus sont greffées dans la VZ/SVZ, il s'avère que leur progéniture est constituée d'astrocytes, de neuroblastes et d'interneurones des bulbes olfactifs. L'étape suivante de ce travail a été de démontrer que les cellules gliales radiaires produisent les « futures cellules souches adultes ». Alvarez-Buylla *et al*. (2002) ont montré que des cellules B, C et A constituent le lignage neurogénique dans le cerveau adulte. Les types C et A disparaissent lorsqu'un anti-mitotique est utilisé. Or, ces cellules sont observées en très grand nombre dans le cerveau adulte. En combinant injection de BrdU et marqueurs d'astrocytes, il a été montré que les cellules qui se divisent sont les astrocytes suggérant donc que les cellules progénitrices neuronales sont les astrocytes qui eux-mêmes dérivent des cellules gliales radiaires avant leur régression. Ces auteurs ont montré alors par des expériences *in vitro* avec des neurosphères que les cellules gliales radiaires génèrent des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones suggérant une fois de plus que les cellules gliales radiaires sont à l'origine des cellules progénitrices neuronales dans le cerveau adulte chez les Mammifères (Merkle *et al*., 2004).

II-3.2.2b Neurogénèse adulte chez les oiseaux

Chez les Oiseaux adultes, la seule région, ayant été décrite comme étant neurogénique, est la zone ventriculaire. En effet, des nouveaux neurones sont générés dans les parois des ventricules latéraux et migrent très loin vers le télencéphale (Goldman and Nottebohm, 1983). Chez les oiseaux, les cellules gliales radiaires persistent dans certaines régions du cerveau adulte. De plus, des observations ont suggéré qu'il existe une corrélation entre la présence des cellules gliales radiaires et la neurogénèse adulte chez les oiseaux. En effet, des études immunohistochimiques ont révélé qu'il existe une correspondance entre la localisation des cellules souches neurales, « hot spots » d'intense neurogénèse et la présence de cellules gliales radiaires (Alvarez-Buylla *et al*., 1988). Une étude a ensuite montré que les neurones nouvellement générés dans cette région d'intense activité neurogénique s'éloignent de la VZ, en migrant le long des prolongements des cellules gliales radiaires (Alvarez-Buylla and

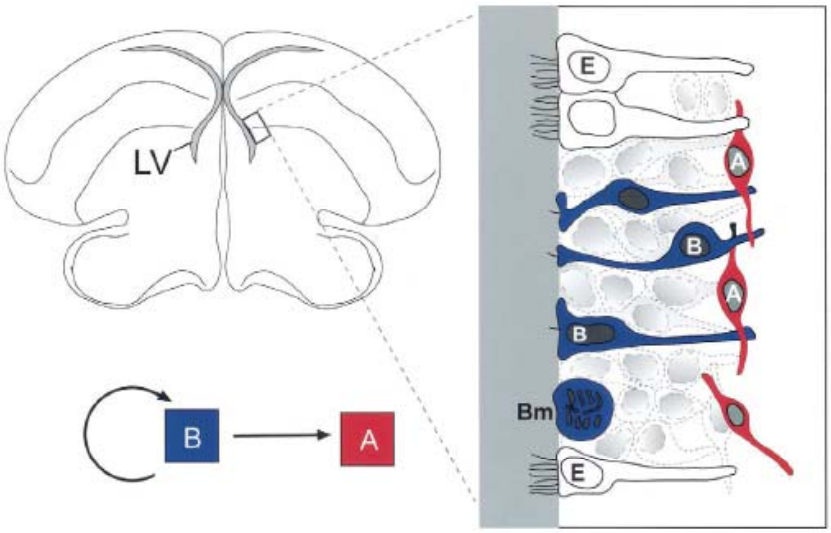


Figure 22 : Processus de neurogenèse chez l'oiseau adulte au niveau des zones ventriculaires latérales (LV). D'après Alvarez-Buylla *et al.*, 2002. Coupe transversale de cerveau de canari (à gauche) et schéma (à droite) des processus de neurogénèse dans cette zone. Les cellules gliales radiaires (cellules B) se divisent de manière asymétrique afin de générer de nouveaux neurones (cellules A) qui vont migrer tangentiellement et radialement le long des prolongements radiaires pour coloniser le télencéphale.

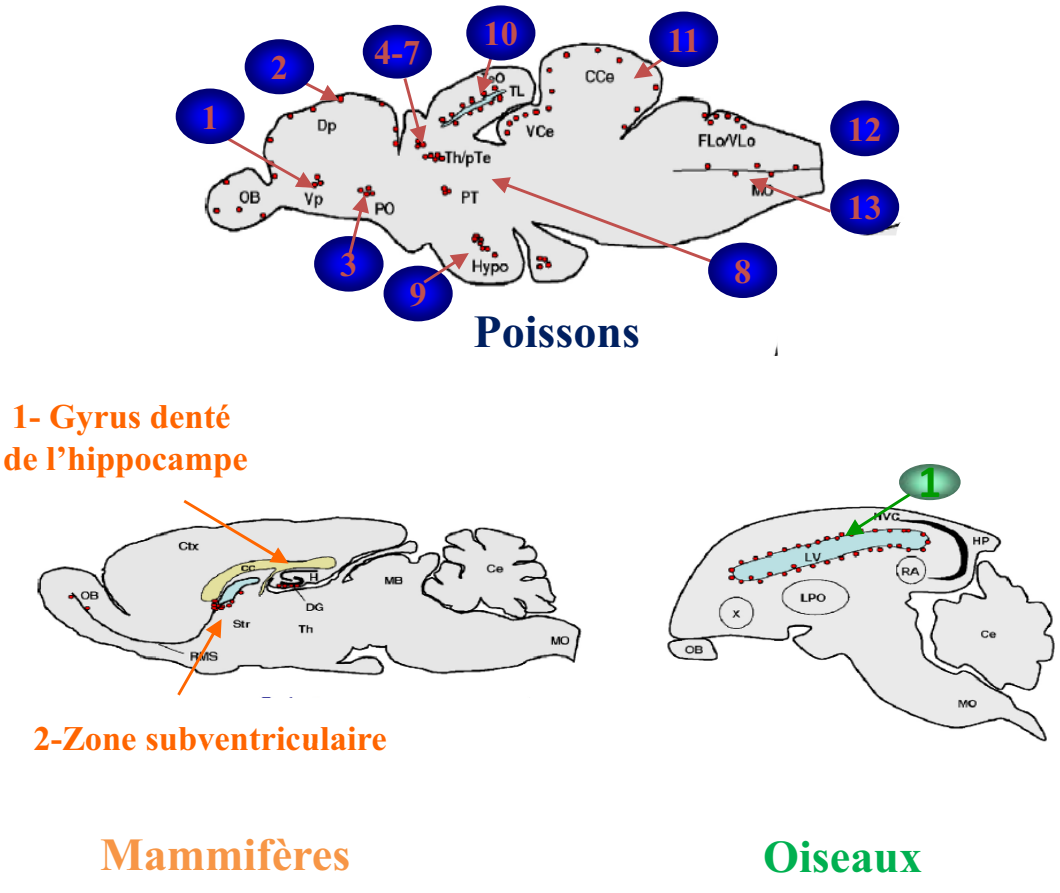


Figure 23 : Représentation schématique des zones de prolifération dans le cerveau des poissons, mammifères et oiseaux. Adapté de Lindsey et Tropepe, 2006. Les points rouges correspondent aux zones de prolifération. L'ensemble de plusieurs zones dans une même région est appelée niche, celles-ci étant représentées en bleu pour les poissons, en orange pour les mammifères et en vert pour les oiseaux.

Nottebohm, 1988). Par la suite, un autre travail a mis en évidence le fait que la division des cellules gliales radiaires correspond à l'apparition de nouveaux neurones dans le cerveau antérieur des oiseaux, suggérant que les cellules gliales radiaires sont à l'origine des nouveaux neurones (Alvarez-Buylla, 1990). En utilisant un rétrovirus, des travaux (Goldman *et al*., 1996) ont également suggéré que les cellules gliales radiaires pouvaient être les cellules progénitrices neuronales. Par la suite, le potentiel progéniteur des cellules gliales radiaires dans le cerveau adulte des Oiseaux a été confirmé (Alvarez-Buylla *et al*., 2002). Les nouveaux neurones naissent dans les murs des ventricules latéraux de la VZ (**Figure 22**). La VZ a des caractéristiques similaires aux régions neurogéniques du cerveau en développement. En effet, les cellules gliales radiaires entrent dans le processus de migration interkinétique, ce qui conduit à la division de ces cellules qui vont donner naissance à de nouveaux neurones, lesquels migrent tangentiellement et radialement pour coloniser le télencéphale où ils se différencieront en neurones matures (Alvarez-Buylla and Garcia-Verdugo, 2002).

II-3.2.2c Neurogénèse adulte chez les poissons

Une particularité des poissons connue depuis de nombreuses années concerne la capacité de leur cerveau à croître tout au long de la vie. Cette particularité est liée au phénomène de croissance continue chez les poissons (Brandstatter and Kotrschal, 1989; Brandstatter and Kotrschal, 1990). Des comptages de cellules en prolifération, réalisés sur des poissons juvéniles et adultes, ont ainsi permis de mettre en évidence le fait que le nombre de cellules dans le cerveau des poissons augmente avec l'âge, le poids de l'animal et la longueur du corps de l'animal (Kranz and Richter, 1970; Zupanc and Horschke, 1995). De plus, il existe une forte activité de prolifération dans le cerveau adulte en cas de lésion. En effet, le cerveau des poissons, ainsi que celui des amphibiens et des reptiles, est connu pour avoir une très grande capacité de régénération et donc une très forte activité de prolifération (Caton *et al*., 1980; Kranz and Richter, 1975; Zupanc, 2006) (**Figure 23**).

D'autre part, les poissons sont un modèle particulier car, contrairement aux mammifères et aux oiseaux, la neurogénèse chez les poissons adultes n'est pas limitée à une ou deux régions, dans la mesure où une forte activité de prolifération a été démontrée dans tout le cerveau adulte chez plusieurs espèces, telles que l'épinoche (Ekstrom *et al*., 2001). En combinant immunohistochimie avec différents marqueurs de prolifération et incorporation de thymidine tritiée ou de BrdU, de nombreuses zones d'activité prolifératrices ont été décrites dans tout le cerveau adulte notamment dans les bulbes olfactifs, le télencéphale, l'aire

préoptique, le thalamus, l'hypothalamus et le cervelet (Ekstrom *et al*., 2001). Cependant, la nature des cellules qui se divisent n'a pas été identifiée, pas plus que le phénotype des cellules nouvellement générées. De plus, une caractéristique de ces cellules en division est qu'elles sont toujours positionnées en bordure de ventricules. Une autre étude se focalisant sur le cervelet a décrit des cellules nouvellement générées, immunoréactives pour la BrdU, le long des prolongements radiaires des cellules gliales GFAP-positives. Ces données suggèrent donc que les cellules gliales radiaires pourraient servir de support de migration aux cellules nouvellement générées, comme il est possible d'observer ce phénomène durant la neurogénèse embryonnaire chez les mammifères (Zupanc and Clint, 2003). De plus, dans les cas de lésion, pendant la régénération, ces mêmes auteurs ont observé une très forte augmentation de l'immunoréactivité des cellules avoisinant la lésion pour la vimentine et la GFAP.

Ces résultats suggèrent donc à nouveau que les cellules gliales radiaires jouent un rôle dans la génération de nouveaux neurones. Alors que chez les mammifères, les cellules gliales radiaires régressent à la fin de la neurogénèse embryonnaire, chez les poissons adultes, les cellules gliales radiaires persistent dans tout le cerveau notamment dans le télencéphale, l'aire préoptique et l'hypothalamus (Onteniente *et al*., 1983). Cette persistance des cellules gliales radiaires chez les poissons adultes a été démontrée chez différentes espèces notamment la truite arc-en-ciel, le poisson zèbre et le poisson crapaud grâce à des anticorps anti-aromatase (Forlano *et al*., 2001; Menuet *et al*., 2003; Menuet *et al*., 2005). La persistance des cellules gliales radiaires est particulièrement intéressante, puisqu'elles sont positionnées en bordure de ventricule et notamment dans les régions neuroendocriniennes où il a été montré une forte activité de prolifération en bordure de ventricule. Cependant, l'absence de marqueur de cellules gliales radiaires dans le cerveau de poissons n'a pas permis d'étudier le rôle de ces cellules dans le cerveau adulte. Une hypothèse serait que les cellules gliales radiaires pourraient être des cellules progénitrices dans le cerveau adulte des poissons.

III- ŒSTRADIOL ET NEUROGENESE

Une particularité fortement intrigante des poissons téléostéens est le très haut niveau d'expression de l'aromatase, enzyme de synthèse de l'œstradiol, dans les cellules gliales radiaires. La signification physiologique de cette forte expression est cependant inconnue à ce jour, car très peu d'études ont cherché à établir un lien entre synthèse d'œstrogènes dans les

cellules gliales radiaires et neurogénèse. Toutefois cette particularité est intéressante puisque, chez les autres vertébrés, un nombre croissant d'études tend à démontrer les rôles potentiels de l'œstradiol dans les processus de neurogénèse en conditions physiopathologiques, mais également en conditions physiologiques.

III-1 CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

III-1.1 Développement

Une étude *in vitro* a montré des effets différentiels de l'E2, s'il est administré seul ou en présence de facteurs de croissance. En effet, en présence d'EGF, l'administration d'E2 diminue la prolifération de cellules souches neurales (NSC) de rat pendant le développement. Par contre, si l'E2 est administré seul, le nombre de NSC en division augmente (Brannvall *et al*., 2002). D'autre part, cet effet de l'E2 semble impliquer les ERs, puisque l'administration d'E2, associée à un antagoniste des ERs, conduit à une diminution de la prolifération des NSC. Enfin, en utilisant des marqueurs d'astrocytes (GFAP) et de neurones nouvellement générés (β-tubuline), ces auteurs ont montré que l'E2 a un effet positif sur la différenciation neuronale, car il diminue le nombre de cellules gliales et augmente le nombre de neurones par rapport aux NSC contrôles (Brannvall *et al*., 2002). Une autre étude réalisée *in vivo* chez la souris a mis en évidence un rôle de l'E2 *via* le ERβ. En effet, l'invalidation d'ERβ entraîne une migration anormale des neurones pendant le développement et une augmentation des cellules en apoptose (Wang *et al*., 2003a).

Plus récemment, il a été démontré que, durant l'embryogénèse corticale chez la souris, les cellules gliales radiaires sont immunoréactives pour l'aromatase et sont des progéniteurs. L'activité proliférative de ces cellules diminue après traitement de la mère par un inhibiteur d'aromatase (Martinez-Ceredeno *et al*., 2006).

III-1.2 Adulte

De plus en plus de travaux sont consacrés au rôle potentiel de l'E2 dans la neurogénèse adulte. Cependant, les résultats de ces études préliminaires sont parfois contradictoires.

L'étude réalisée par Branvall *et al*. (2002) sur des NSC de rat pendant l'embryogénèse a également été menée sur des NSC de rats adultes. Il a été ainsi mis en évidence, comme pendant l'embryogénèse, que l'E2 semble diminuer la prolifération des NSC adultes lorsque celles-ci sont traitées à l'EGF. Cependant lorsque l'E2 est administré seul, l'effet positif

observé sur la prolifération des NSC embryonnaires n'a pas été reproduit sur les NSC adultes. De même, l'effet bénéfique de l'E2 sur la différenciation neuronale n'a pas été observé dans les NSC adultes.

A l'inverse, des travaux menés sur le gyrus denté de l'hippocampe de rat adulte femelle ont montré qu'après injection de BrdU, l'E2 augmente le nombre de cellules en prolifération au bout de 4h. Puis, au terme de 48h, l'E2 diminue le nombre de cellules en division (Ormerod *et al*., 2003). Cet effet de l'E2 sur la prolifération dans l'hippocampe ferait participer l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénal puisqu'une surrénalectomie abolit l'effet suppresseur de l'E2 sur les cellules en prolifération. Cette étude met donc en évidence un effet de l'E2 dépendant du temps et de la participation des stéroïdes de la glande adrénale. Ces mêmes auteurs ont montré par la suite qu'après 6-10 jours, le nombre de cellules BrdU positives augmente chez des mâles « meadow voles » gonadectomisés après injection d'E2. Enfin, ces auteurs se sont intéressés à l'effet de l'E2 sur l'apoptose et ont remarqué que, chez les animaux traités à l'E2, le nombre de noyaux pycnotiques, témoignant de l'entrée des cellules en mort cellulaire, diminue. Ces résultats suggèrent donc que l'E2 favoriserait la survie des nouveaux neurones dans l'hippocampe de rats mâles adultes (Ormerod *et al*., 2004).

Enfin, une autre étude suggère que les effets de l'E2 dépendent de la dose, du sexe des animaux, de l'espèce étudiée ou bien encore de la phase du cycle sexuel des animaux (Galea *et al*., 2006). En effet, une dose supraphysiologique d'E2 n'a aucun effet favorable ou défavorable sur l'augmentation du nombre de cellules en prolifération ou la survie des nouveaux neurones. D'autre part, l'injection d'E2 a un effet positif sur la croissance des neurites seulement si l'injection d'E2 a lieu en début de phase d'extension des axones. Ces différents travaux suggèrent donc que les effets de l'E2 dépendent de nombreux paramètres.

III-2 REPARATION NEURONALE

Comme déjà signalé, des études menées sur les mammifères et les oiseaux ont montré un rôle potentiel de l'E2 dans des situations physiopathologiques. En cas de lésions chimiques et mécaniques dans l'hippocampe chez des souris et des rats, une forte expression d'aromatase est observée dans des astrocytes réactifs avoisinant la lésion, alors qu'en condition normale, l'enzyme de synthèse de l'E2 n'est exprimée que dans les neurones (Garcia-Segura *et al*., 1999a). De plus l'injection d'E2 avant la lésion permet de diminuer l'étendue de la lésion et le nombre de cellules en apoptose. Chez les oiseaux, une lésion hemi-latérale de l'hippocampe a

mis en évidence une sur-régulation des messagers et de la protéine aromatase *de novo* dans les astrocytes avoisinant la lésion, alors que dans l'hémisphère controlatéral n'ayant pas subi de lésion, l'aromatase est exclusivement exprimée dans les neurones (Peterson *et al*., 2001). Chez le serin une autre étude a mis en évidence une très forte expression de l'aromatase dans la glie radiaire au regard d'une lésion de l'hippocampe. De manière intéressante, une très forte activité de prolifération est mise en évidence dans cette zone, sans que les cellules progénitrices soient identifiées. De plus, les cellules nouvellement générées sont étroitement accolées aux fibres radiaires avoisinant la lésion suggérant la migration de ces cellules le long des fibres (Peterson *et al*., 2004).

Certains travaux récents ont également mis en lumière le rôle des récepteurs aux œstrogènes dans la réparation neuronale suite à une ischémie expérimentale. En effet, un traitement à l'œstradiol stimule fortement l'activité prolifératrice réparative. Cet effet impliquerait les ERα et les ERβ car la prolifération est réduite chez des souris ERαKO ou ERβKO (Suzuki *et al*., 2007).

Ces différentes données attirent l'attention sur les particularités remarquables des poissons concernant, d'une part, l'expression d'aromatase dans les cellules gliales radiaires et, d'autre part, la capacité unique de nombreuses régions du cerveau de poisson adulte à proliférer. Ainsi, ces caractéristiques nous ont conduits à émettre l'hypothèse d'un lien entre l'E2 et les processus de neurogénèse.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les travaux décrits dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de l'UMR-CNRS 6026 de l'université de Rennes 1, dans l'équipe « Aromatase, Œstrogènes et Neurogénèse» (NAO). Un des axes de recherche de cette équipe s'articule autour de la compréhension des mécanismes sous-jacents à la neurogénèse, et notamment chez les poissons téléostéens, qui, comme exposé dans l'introduction, affichent plusieurs particularités à ce niveau. En effet, les poissons téléostéens présentent une importante activité neurogénique et ces zones d'activités sont localisées dans tout le cerveau. Cependant, peu d'informations existent sur les mécanismes responsables de cette intense neurogénèse. De plus, l'aromatase, enzyme de synthèse de l'E2, possède des caractéristiques intrigantes chez ces espèces. Tout d'abord, suite à une duplication du génome, deux gènes codent une aromatase, dont le gène *cyp19a1b* qui code la forme cérébrale de l'aromatase, appelée aromatase B. Une autre spécificité réside dans la forte expression de cette enzyme dans les cellules gliales radiaires de ces espèces et sa forte stimulation par l'E2. Cette régulation de l'aromatase B par l'E2 nécessite la présence d'un ERE fonctionnel présent sur le promoteur du gène *cyp19a1b*, un contexte neuroglial et implique les ERs.

Au contraire, chez les mammifères et les oiseaux, la neurogénèse adulte est limitée à une ou deux régions. D'autre part, l'aromatase est exprimée principalement dans les neurones et son activité est maximale pendant une période critique du développement embryonnaire puis son expression décline. De plus en plus d'études mettent également en avant les rôles de l'E2 dans les processus de neurogénèse adultes dans des conditions physiopathologiques, dans lesquelles l'aromatase est exprimée *de novo* dans des cellules gliales, les astrocytes. Enfin, chez les mammifères, les cellules gliales radiaires ne sont pas présentes dans le cerveau adulte puisqu'elles régressent à la fin de la neurogénèse embryonnaire. Néanmoins, pendant le développement, ces cellules constituent les cellules progénitrices neuronales et, chez les adultes, les cellules progénitrices neuronales sont dérivées des cellules gliales radiaires embryonnaires.

L'ensemble de ces données, les similarités tout comme les différences entre poissons et mammifères, amènent à penser que le maintien de la forte activité neurogénique, chez les poissons adultes, pourrait être lié, voire modulé, par l'E2. L'objectif de ce travail consistait donc, d'une part, à étudier les processus de neurogénèse chez le poisson zèbre adulte, et, d'autre part, à approfondir la compréhension que nous avons des mécanismes d'expression de

l'aromatase dans le cerveau des poissons ainsi que de la signification physiologique de cette forte expression d'aromatase dans des cellules gliales radiaires. Le questionnement sous-jacent à ce programme était d'établir l'existence, ou non, d'un lien entre la signalisation œstrogénique et les processus de neurogénèse chez les poissons et de savoir si ce lien constitue une caractéristique évolutive des poissons ou une exagération d'un mécanisme discret observé chez les mammifères.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressée à étudier les processus de neurogénèse chez le poisson zèbre adulte et le rôle exercé par les cellules gliales radiaires dans ces phénomènes. Afin de répondre à la question de savoir si les cellules gliales radiaires, qui expriment fortement l'aromatase, sont des cellules progénitrices chez le poisson zèbre adulte, nous avons combiné des traitements à la BrdU, un analogue de la thymidine qui s'incorpore pendant la phase S, et des expériences d'immunohistochimie suivant l'expression de différents marqueurs (marqueur de prolifération, marqueurs neuronaux).

Dans une deuxième partie, nous avons approfondi les études portant sur les mécanismes de régulation de l'aromatase B. Des expériences menées *in vivo*, par RT-PCR en temps réel et immunohistochimie, ainsi qu'une étude *in vitro* par transfection transitoire du promoteur *cyp19a1b* dans une lignée astrocytaire nous ont permis de mieux comprendre la régulation œstrogénique du gène *cyp19a1b*. Enfin, en utilisant ce gène comme référant, nous avons caractérisé la cinétique d'apparition de la signalisation œstrogénique, par des expériences d'hybridation *in toto* et RT-PCR en temps réel à différents stades du développement.

Résultats – Chapitre 1

Aromatase B, cellules gliales radiaires et neurogénèse

Partie 1 ……42

Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish

Elisabeth Pellegrini*, Karen Mouriec*, Isabelle Anglade, Arnaud Menuet, Yann Le Page, Marie-Madeleine Gueguen, Marie-Hélène Marmignon, François Brion, Farzad Pakdel, Olivier Kah. * These authors contributed equally to this work.

J COMP NEUROL. 2007 Mar 1 ; 501(1) : 150-67.

Partie 2 ……60

A *cyp19a1b*-GFP (Aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells

Sok-Keng Tong, Karen Mouriec, Ming-Wei Kuo, Elisabeth Pellegrini, Marie-Madeleine Gueguen, François Brion, Olivier Kah, Bon-chu Chung.

GENESIS, in press

Résultats – Chapitre 1, Partie 1

Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish

Elisabeth Pellegrini*, Karen Mouriec*, Isabelle Anglade, Arnaud Menuet, Yann Le Page, Marie-Madeleine Gueguen, Marie-Hélène Marmignon, François Brion, Farzad Pakdel, Olivier Kah. * These authors contributed equally to this work.

J COMP NEUROL. 2007 Mar 1 ; 501(1) : 150-67.

De nombreuses zones d'activité prolifératives ont été décrites dans le cerveau des poissons téléostéens adultes, ces derniers possèdent également une forte capacité de régénération. Cependant, les travaux, dont sont issues ces conclusions, n'ont pas caractérisé la nature des cellules progénitrices. Chez les Mammifères, les cellules gliales radiaires constituent les cellules progénitrices neuronales lors de la neurogénèse embryonnaire; la persistance de ces cellules dans le cerveau des poissons téléostéens adultes est donc intrigante. L'aromatase B s'étant révélée comme un bon marqueur de cellules gliales radiaires, nous avons donc pu étudier les rôles de ces cellules dans le cerveau adulte d'un poisson téléostéen, le poisson zèbre, et notamment considérer l'hypothèse qu'elles pouvaient être des cellules progénitrices.

En combinant traitement à la BrdU et immunohistochimie avec un anticorps anti-aromatase B et en utilisant des marqueurs neuronaux, nous avons ainsi pu montrer: (1) que les cellules gliales radiaires sont capables de se diviser activement; (2) que les cellules nouvellement générées peuvent à nouveau se diviser; (3) qu'au fil du temps, les cellules nouvellement générées s'éloignent du ventricule et migrent le long des prolongements radiaires; et (4) que les cellules nouvellement générées se différencient en neurones. Ces résultats montrent donc, pour la première fois, que les cellules gliales radiaires aromatase B-positives sont des cellules progénitrices neuronales dans le cerveau adulte de poisson zèbre.

Ces résultats apportent de nouvelles informations sur la neurogénèse adulte chez les poissons. Ils participent, d'une part, à une meilleure compréhension des processus de neurogénèse chez l'adulte et, d'autre part, mettent en avant le rôle primordial des cellules gliales radiaires dans la neurogénèse adulte chez les poissons, ces cellules disparaissant à la fin de la neurogénèse embryonnaire chez les Mammifères. Enfin, la très forte expression de l'aromatase B, l'enzyme de synthèse de l'œstradiol, dans ces cellules progénitrices neuronales, suggère l'existence d'un lien entre l'œstradiol et la forte neurogénèse chez les poissons adultes.

THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY 501:150–167 (2007)

Identification of Aromatase-Positive Radial Glial Cells as Progenitor Cells in the Ventricular Layer of the Forebrain in Zebrafish

ELISABETH PELLEGRINI,[1] KAREN MOURIEC,[1] ISABELLE ANGLADE,[1] ARNAUD MENUET,[1] YANN LE PAGE,[1] MARIE-MADELEINE GUEGUEN,[1] MARIE-HÉLÈNE MARMIGNON,[1] FRANÇOIS BRION,[2] FARZAD PAKDEL,[1] AND OLIVIER KAH[1]*

[1]Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction, UMR CNRS 6026, Université de Rennes 1, 35042 Rennes, France

[2]INERIS, Direction des Risques Chroniques, Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

ABSTRACT

Compared with other vertebrates, the brain of adult teleost fish exhibits two unique features: it exhibits unusually high neurogenic activity and strongly expresses aromatase, a key enzyme that converts aromatizable androgens into estrogens. Until now, these two features, high neurogenic and aromatase activities, have never been related to each other. Recently, it was shown that aromatase is expressed in radial glial cells of the forebrain and not in neurons. Here, we further document that Aromatase B is never detected in cells expressing the markers of postmitotic neurons, Hu and acetylated tubulin. By using a combination of bromodeoxyuridine (BrdU) treatment and immunohistochemical techniques, we demonstrate for the first time to our knowledge that aromatase-positive radial cells actively divide to generate newborn cells in many forebrain regions. Such newborn cells can further divide, as shown by BrdU-proliferating cell nuclear antigen double staining. We also demonstrate that, over time, newborn cells move away from the ventricles, most likely by migrating along the radial processes. Finally, by using antisera to Hu and acetylated tubulin, we further document that some of the newborn cells derived from radial glia differentiate into neurons. These data provide new evidence for the mechanism of neurogenesis in the brain of adult fish. In addition, given that estrogens are well-known neurotrophic and neuroprotective factors affecting proliferation, apoptosis, migration, and differentiation, the expression of aromatase in the neural stem cells of the adult strongly demonstrates that the fish brain is an outstanding model for studying the effects of estrogens on adult neurogenesis and brain repair. J. Comp. Neurol. 501:150–167, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Indexing terms: neurogenesis; radial glia; aromatase; estradiol; brain; teleost fish; zebrafish

The brain of adult teleost fish is characterized by the presence of a spectacular aromatase activity, the functions of which are far from being understood (Pasmanik and Callard, 1988; Pellegrini et al., 2005). This aromatase activity is the result of the expression of the *cyp19b* gene, one of the two *cyp19* genes issued from a duplication that occurred early in the teleost lineage (Tchoudakova and Callard, 1998). This *cyp19b* gene, generating aromatase B (AroB), is mostly expressed in the brain, whereas *cyp19a*, generating AroA, is mostly expressed in the gonads (Kishida and Callard, 2001; Tchoudakova et al., 2001; Kwon, 2002; Wong et al., 2005). We and others have recently shown that, surprisingly, AroB protein and mRNA expression is restricted to the radial glial cells of the adult fish. This was first shown in the plainfin midshipman and then in trout, zebrafish, and pejerrey (Forlano et al., 2001;

Grant sponsor: the European Union; Grant number: QLRT-2001-00603-EDEN; Grant sponsor: Centre National de la Recherche Scientifique; Grant sponsor: the French Ministry for Education and Technology (ACI Biologie du Développement et Physiologie Intégrative).

Elisabeth Pellegrini and Karen Mouriec contributed equally to this work.

*Correspondence to: O. Kah, Ph.D., Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction, UMR CNRS 6026, Bât. 13, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France. E-mail: olivier.kah@univ-rennes1.fr

Received 24 May 2006; Revised 13 July 2006; Accepted 28 August 2006

DOI 10.1002/cne.21222

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

© 2007 WILEY-LISS, INC.

WILEY InterScience® DISCOVER SOMETHING GREAT

Menuet et al., 2003, 2005; Strobl-Mazzulla et al., 2005). In zebrafish, AroB-positive radial glial cells are most abundant in the forebrain, notably in the olfactory bulbs, the pallial and subpallial regions, the preoptic area, and the mediobasal hypothalamus, in particular along the lateral and posterior recesses (Menuet et al., 2005). Such radial cells are characterized by a small nucleus adjacent to the ventricles and long cytoplasmic extensions terminating in end feet at the brain surface (Rakic, 1978).

The finding of the expression of AroB in radial glial cells was rather intriguing because in birds and mammals, aromatase is expressed in neurons under normal conditions (Lephart, 1996; Balthazart and Ball, 1998). The physiological significance of the presence of a high amount of aromatase is currently unknown, but given the well-documented function of radial cells in embryonic and adult neurogenesis (Gotz and Barde, 2005; Mori et al., 2005), a link between the presence of aromatase B in radial cells and the high neurogenic activity of the adult fish brain has been suggested (Forlano et al., 2001; Menuet et al., 2005; Pellegrini et al., 2005).

The interest of neuroscientists in astroglial cells was considerably increased when their function as adult neural stem cells and their contribution to neurogenesis were envisioned. The role of radial cells in embryonic neurogenesis is now strongly established (Gotz and Barde, 2005; Mori et al., 2005). It has long been known that such cells provide a scaffold for newly generated neurons that migrate along the long cytoplasm extensions to deeper brain layers (Rakic, 1978). However, more recently a major change in our current vision of radial cells occurred when several groups demonstrated that radial cells not only provide support to newly generated neurons but also generate new neurons through asymmetrical divisions (Malatesta et al., 2000; Noctor et al., 2001, 2002, 2004). It has long been assumed that at the end of neurogenesis, radial cells transform into astrocytes in the mammalian adult brain, which do not contain radial glia (Mori et al., 2005). In contrast, radial cells largely persist in the brain of other vertebrates notably in bird (Alvarez-Buylla et al., 1987) and fish (Rakic, 1978; Onteniente et al., 1983), whose brain is well known to keep growing during adulthood by only partially understood mechanisms (Zupanc and Zupanc, 1992; Zupanc and Horschke, 1995; Ekström et al., 2001; Zupanc, 2001).

It is now well recognized that neurogenesis also continues in the adult brain of mammals and birds (Seri et al., 2001; Alvarez-Buylla and Lim, 2004; Mori et al., 2005), notably in the subventricular zone (Carleton et al., 2002) and the dentate gyrus of the hippocampal formation. In addition, it is increasingly accepted that adult neural stem cells in these regions are astrocytes ultimately derived from radial glia (Merkle et al., 2004; Spassky et al., 2005). It thus appears that radial glial cells are the source of all brain neurons not only during development but also in adults (Gotz, 2003; Ever and Gaiano, 2005; Gotz and Barde, 2005).

Even though the brain of adult fish has long been known to continue growing during adulthood (Kranz and Richter, 1970a,b), there is little information on the underlying mechanisms. Several studies have documented the presence of a number of periventricular proliferative areas in different fish species by using bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation (Zupanc and Horschke, 1995; Zikopoulos et

Abbreviations

A	anterior thalamic nucleus
APN	accessory pretectal nucleus
ATN	anterior tuberal nucleus
Chab	habenular commissure
Chor	horizontal commissure
CM	corpus mamillare
CP	central posterior thalamic nucleus
CPN	central pretectal nucleus
Cpop	postoptic commissure
Cpost	posterior commissure
D	dorsal telencephalic area
Dc	central zone of dorsal telencephalic area
DIL	diffuse nucleus of the inferior lobe
Dl	lateral zone of dorsal telencephalic area
Dm	medial zone of dorsal telencephalic area
DOT	dorsomedial optic tract
Dp	posterior zone of dorsal telencephalic area
DP	dorsal posterior thalamic nucleus
ECL	external cellular layer of olfactory bulb
ENv	entopendoncular nucleus, ventral part
FR	fasciculus retroflexus
GL	glomerular layer of olfactory bulb
Had	dorsal habenular nucleus
Hav	ventral habenular nucleus
Hc	caudal zone of periventricular hypothalamus
Hv	ventral zone of periventricular hypothalamus
ICL	internal cellular layer of olfactory bulb
IL	inferior lobe
LH	lateral hypothalamic nucleus
LR	lateral recess of diencephalic nucleus
MLF	medial longitudinal fascicle
NMLF	nucleus of medial longitudinal fascicle
NRP	nucleus of the posterior recess
OB	olfactory bulb
OT	optic tract
PGa	anterior preglomerular nucleus
PGl	lateral preglomerular nucleus
Pit	pituitary
PP	periventricular pretectal nucleus
PO	posterior pretectal nucleus
PPa	parvocellular preoptic nucleus, anterior part
PPp	parvocellular preoptic nucleus, posterior part
PR	posterior recess of diencephalic ventricle
PSp	parvocellular superficial pretectal nucleus
PTN	posterior tuberal nucleus
R	rostrolateral nucleus
RL	recessus lateralis
rpo	preoptic recess
SC	suprachiasmatic nucleus
SD	saccus dorsalis
Tel v	telencephalic ventricle
TeO	tectum opticus
TL	torus longitudinalis
TLa	torus lateralis
TPp	periventricular nucleus of posterior tuberculum
TS	torus semicircularis
v	telencephalic ventricle
V	ventral telencephalic area
VCe	valvula cerebelli
Vd	dorsal nucleus of ventral telencephalic area
VL	ventrolateral thalamic nucleus
VM	ventromedial thalamic nucleus
VOT	ventrolateral optic tract
Vp	postcommissural nucleus of ventral telencephalic area
Vv	ventral nucleus of dorsal telencephalic area
ZL	zona limitans
III	third ventricle

al., 2000; Ekström et al., 2001), including the zebrafish (Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). Very recently, it was shown that, with time, newborn cells in the zebrafish brain move away from the ventricles suggesting that they migrate and ultimately differentiate into neurons (Zupanc and Horschke, 1995; Grandel et al., 2006). However, those studies have mainly focused on the telencephalon and the cerebellum (Zupanc and Horschke, 1995; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). Although it has been suggested, the participation of radial glial cells in active adult neurogenesis is poorly documented (Zupanc and Horschke, 1995; Zupanc and Clint, 2003; Zupanc, 2006). One of the reasons for this lack of information is the absence of suitable markers of radial cells in fish. Indeed, well-established astroglial markers such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), vimentin, or protein S-100 only labeled some of the radial cells, and staining was often restricted to either the perikarya or long processes (unpublished data).

Taking advantage of the strong staining of radial cells with AroB in the forebrain, we decided to investigate the potential progenitor nature of radial cells in zebrafish by focusing our study on the forebrain, i.e., the telencephalon and diencephalon, where AroB expression in radial cells is maximal (Menuet et al., 2005). Here, we demonstrate that there is a strong correlation between the presence of AroB-positive radial cells and that of newborn cells as assessed by BrdU labeling. We demonstrate that these radial cells actively divide to generate new cells, which can further divide and/or migrate along the radial cytoplasmic processes. We describe the radial migration pattern of newborn cells and further document their differentiation into neurons in the telencephalon and diencephalon.

MATERIALS AND METHODS

Animals and BrdU treatment

The zebrafish (*Danio rerio*) used in this study were kept, handled, and sacrificed in accordance with European Union regulations concerning the protection of experimental animals. Sexually mature male and female zebrafish (6–10-month-old animals; size range: 3.5–4 cm) were obtained from a local supplier and maintained under standard conditions of constant temperature (28.5°C) under a 12-hour dark/12-hour light artificial photoperiod.

To label proliferating cells in the adult zebrafish brain, in vivo BrdU incorporation experiments were performed on both males and females. Animals were placed in water containing 1 mM of BrdU (Sigma, St. Louis, MO) for 12, 24, or 48 hours and sacrificed immediately at the end of the treatment. In the case of the group treated for 48 hours, some of the animals were sacrificed immediately after BrdU exposure, and others were allowed to survive in fresh water for 5, 10, 15, 30, or 45 days after treatment. At the end of the experiments, fish were anesthetized on ice, and sex was determined by direct examination of the gonad under a dissecting microscope. The brain was carefully removed and fixed overnight in a 4% paraformaldehyde phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) for immunohistochemistry processing.

Antibodies

For AroB detection, we used a rabbit polyclonal antibody raised against the synthetic peptide CNSNGETADNRTSKE, corresponding to the last 15 residues (residues 497–511) of the zebrafish AroB sequence (AF183908). The specificity of this antibody was assessed previously by preadsorption with the synthetic peptide, by comparison with the distribution of AroB messengers, and by Western blotting (Menuet et al., 2005). Furthermore, this antibody gives the same result as another antiserum raised against recombinant zebrafish AroB (Menuet et al., 2005). For BrdU immunohistochemistry, we used two commercial antibodies, a rat monoclonal anti-BrdU (1:100; clone BU1/75 [ICR1]; Reference ab6326, Abcam, Cambridge, UK) and a mouse monoclonal anti-BrdU (1:100; clone Bu20a; Reference MO744, DAKO, Glostrup, Denmark). These two antibodies result in a similar nuclear staining due to recognition of single-stranded BrdU-labeled DNA following DNA denaturation. No staining was obtained in control animals not treated with BrdU or when the primary antibody was omitted. Cell proliferation was also monitored by using a mouse monoclonal anti-rat PCNA (1:100; clone PC10; Reference MO879, DAKO). This antibody has been shown to react with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in a wide range of species including fish and causes nuclear staining similar to BrdU, as previous studies have shown (Wullimann and Puelles, 1999; Bang et al., 2001; Villar-Cheda et al., 2006). PCNA antibody specificity was tested by the supplier. Additionally, in sections processed without the primary antibody, no immunostaining was observed.

For identification of neurons, we used a mouse monoclonal anti-acetylated tubulin (1:100; Acetyl-Tub; clone 6-11B-1; Reference T 6793, Sigma). This antibody was raised against Acetyl-Tub of a sea urchin and has been used for detection of Acetyl-Tub from many organisms including zebrafish. Staining achieved with this antibody gave a cytoplasmic staining similar to that obtained in previous studies in zebrafish (Huan and Sato, 1998; Chitnis and Kuwada, 1990), and in particular did not stain the radial glial cells. A mouse monoclonal antibody against the human HuC/HuD nuclear protein (1:20; clone 16A11; Reference A21271, Molecular Probes, Eugene, OR) was also used for neuronal characterization. This antibody was shown to be suitable for Hu detection in many species including fish and results in a nuclear staining similar to that in previous studies (Henion et al., 1996; Forlano et al., 2001; Zupanc et al., 2005). Furthermore, this antibody did not label radial glial cells. In all cases, omission of the primary antibody gave negative results.

Aromatase B detection was performed by using either a Texas red-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:200; Vector, Burlingame, CA) or a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:200; Pierce, Rockford, IL) revealed with diaminobenzidine (Menuet et al., 2005).

For BrdU staining, we used a biotin-conjugated goat anti-rat or anti-mouse antibody (1:1500; Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France) and a streptavidin-peroxidase complex (1:1500; Tebu-Bio); BrdU-positive cells were revealed by using a nickel intensification protocol (Shu et al., 1988), resulting in a black precipitate. For double-immunofluorescence staining, we used the rat anti-BrdU primary antibody and a secondary goat anti-rat Alexa fluor 594 antibody (1:200; Molecular Probes), in combination with either the rabbit anti-AroB antibody, which was revealed with Texas red-conjugated goat anti-rabbit antibody, or mouse anti-PCNA, mouse anti-Acetyl-Tub, or mouse anti-Hu antibodies, which were visualized by using

a goat anti-mouse Alexa fluor 488 secondary antibody (1:200; Molecular Probes). Primary and secondary antibodies were prepared at the appropriate dilutions in PBS containing 0.5% milk powder.

Immunohistochemistry

All staining was performed on frozen brain sections (12 μm) prepared with a cryostat. For immunofluorescence, tissue sections were first rinsed in PBS, and then nonspecific binding was blocked for 1 hour at room temperature in PBS containing 0.2% Triton and 0.5% milk powder. Sections were then incubated with rat anti-BrdU antibody combined with another primary antibody from a different animal species (see above). This primary antibody cocktail was applied to sections, and slides were kept overnight at room temperature in a humidified chamber. After several washes in PBS 0.2% Triton, tissue sections were incubated with the appropriate secondary antibodies, and slides were then rinsed in PBS. At the end of the immunohistochemistry protocol, cell nuclei were visualized with 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) counterstaining. In the case of double AroB-BrdU staining with peroxidase, tissue sections were first dipped for 30 minutes in PBS containing 0.3% H_2O_2 in order to block endogenous enzyme activity before staining with rabbit anti-AroB and mouse anti-BrdU antibodies. For BrdU immunohistochemistry, incubation with primary antibodies was preceded by denaturation of DNA with 2N HCl at 37°C for 30 minutes followed by a wash in 0.1 M sodium borate solution (pH 8). For PCNA, Acetyl-Tub, and Hu staining, we performed antigen retrieval by submersing the sections in a sodium citrate buffer (pH 6) maintained at 80°C for 30 minutes prior to incubation with primary antibodies.

Microscopy

For fluorescence observations, brain sections were mounted with the antifading medium Vectashield (Vector). In the case of visible light, sections were mounted with a mixture of 50% PBS and 50% glycerol. Observations were carried out on an Olympus Provis photomicroscope equipped with a DP50 digital camera, and micrographs were acquired in TIFF format with Analysis software, allowing image superposition. Whenever necessary, sections were also analyzed with a Leica TCS NT confocal microscope equipped with an argon-krypton laser. Images were then prepared with Adobe Photoshop 7 software for light or contrast adjustment and preparation of the plates.

Nomenclature

The nomenclature for brain nuclei is according to that established in the zebrafish brain atlas by Wullimann and colleagues (1996) with minor modifications.

RESULTS

Aromatase B expression is restricted to radial glial cells and is never observed in cells expressing acetylated tubulin

The expression of AroB in radial glial cells was assessed by immunohistochemistry by using AroB antibodies alone and in combination with a cytoplasmic marker of postmitotic neurons, acetylated tubulin (Acetyl-Tub). The overall pattern of AroB-positive radial cells fully confirmed our previous results showing high expression of AroB in the olfactory bulbs, the ventral and dorsal telencephalon, the preoptic area (Fig. 1A), the thalamic region, and the mediobasal hypothalamus (Fig. 1B). At this level, there is a complex system of ventricular recesses, comprising notably the lateral and posterior recesses, which are both bordered by extremely numerous and strongly AroB-immunoreactive radial cells (Fig. 1B–D). The radial nature of such cells is clearly evidenced by their morphology, which consists of a small nucleus located close to the ventricle and long cytoplasmic extensions terminating with end feet at the brain surface (Fig. 1A–C). A large majority of these radial cells have a small round nucleus located close to the ventricles, but the nuclei of some cells are one to three cell diameter(s) away from the ventricle. In contrast, the nuclei of the AroB-positive cells in the posterior recess are seven to eight cell diameters away from the ventricles, and these cells have short cytoplasmic process directed toward the ventricle (Fig. 1D). In many brain regions, the extremities of the radial processes strongly underline the brain surface (Fig. 1C).

Attempts to colocalize AroB with classical markers of astroglial cells in mammals, such as GFAP or vimentin only resulted in coexpression at the level of the preoptic area and only at the extremities of the long radial processes (data not shown). Nevertheless, in addition to the typical morphology of the radial cells, evidence that AroB is not expressed in neurons was demonstrated by the fact that there was absolutely no coexpression of AroB with Acetyl-Tub (Fig. 1E–J) or Hu (data not shown). Acetyl-Tub antibodies cause an intense staining of the axons and cell bodies throughout the brain of developing (Chitnis and Kuwada, 1990) and adult zebrafish (Huang and Sato, 1998). Almost all Acetyl-Tub- and Hu-expressing cells occurred immediately adjacent to the ependymal layer or deeper in the parenchyma and were only occasionally found adjacent to the ventricle (Fig. 1E–G). Double staining with the two cytoplasmic markers AroB and Acetyl-Tub indicated that cells positive for AroB were always negative for Acetyl-Tub and vice versa (Fig. 1E–J), which was verified on a confocal microscope demonstrating the total absence of overlapping staining (Fig. 1H–J).

Proliferative cells in the forebrain of zebrafish

To study proliferation in the forebrain of zebrafish, we performed BrdU staining following 12, 24, or 48 hours of exposure. This thymidine analogue integrates into the DNA of cells in the S phase and permanently labels cells that were in the S phase at the time of treatment. With the aim of investigating the fate of the newborn cells, animals were sacrificed at 12, 24, and 48 hours or 3, 5, 10, 15, 30, and 45 days after BrdU treatment. As the distribution of proliferative cells was similar to that reported in other studies in stickleback, brown ghost, and zebrafish, this will not be described in detail (Zupanc and Horschke, 1995; Ekström et al., 2001; Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). Briefly, soon after treatment (12 and 24 hours), BrdU-labeled cells occurred (with no exception) very close to the ventricular surface (Fig. 1K–M). In contrast, as soon as 2, 3, or 5 days after 24-hour BrdU exposure, we observed some of the newborn cells some distance away from the ventricle, whereas others remained nearby. The most actively proliferating regions were the anterior part of the ventral telencephalon, the

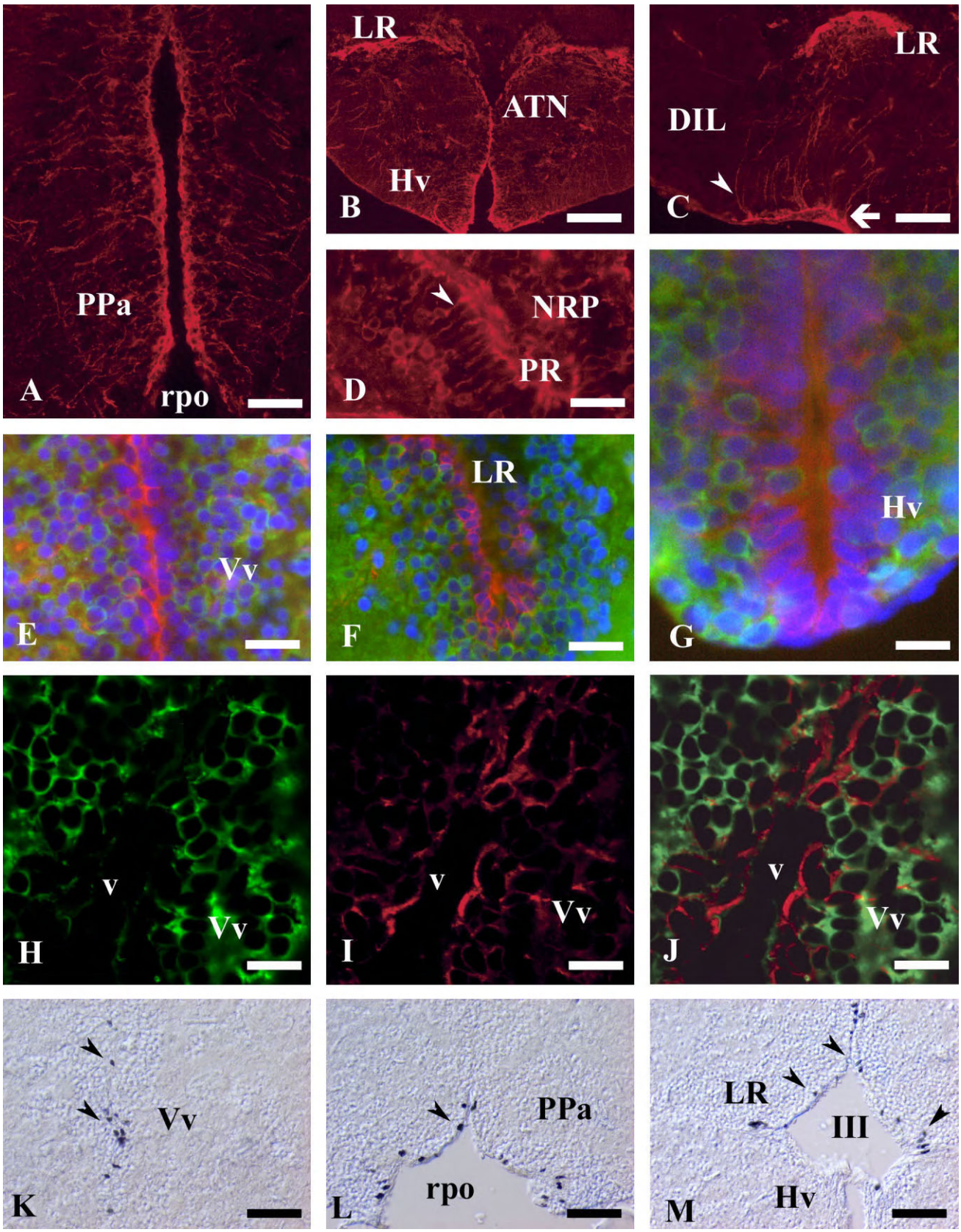

PPa
A
rpo
LR
ATN
Hv
B
LR
DIL
C
NRP
PR
D
Hv
G
Vv
E
LR
F
v
Vv
H
v
Vv
I
v
Vv
J
Vv
K
PPa
rpo
L
LR
III
Hv
M

Figure 1

anterior preoptic area, the thalamic region, the ventromedial hypothalamus, and the regions lining the lateral and posterior recesses. These proliferative regions were compared in males (n = 3) and females (n = 3), and no striking differences were found. Results are summarized on representative sections of the forebrain in comparison with AroB, as shown in Menuet et al. (2005) (Fig. 2A–G). By using the proliferation marker PCNA, which labels cells in the S phase at the time of sample collection, we also observed numerous stained cells located along the ventricles in a pattern similar to that obtained with BrdU after a short survival time, i.e., in the ventricular layer (Fig. 4D,E).

Radial cells have proliferative activity

Until now, the nature of the cells undergoing proliferation in the brain of adult fish has not been reported. To test whether radial cells could be progenitor cells, we performed AroB/BrdU double labeling after BrdU exposure (12, 24, or 48 hours) and various survival times (12, 24, and 48 hours and 5 days). At short survival times (12 and 24 hours), we found, under confocal microscopy, that a large majority of cells exhibiting BrdU labeling corresponded to AroB-positive radial cells (Fig. 3A–F). At longer survival times (48 hours and 5 days), we still observed that many BrdU-labeled cells were also AroB-expressing radial cells (Fig. 3G–I), but we found an increasing number of BrdU-labeled cells in the vicinity (Fig. 3L) of the doubly AroB/BrdU-positive cells (Fig. 3J–L). Such BrdU/AroB-positive radial cells were abundant in active proliferative regions such as the dorsal telencephalon, the preoptic area, the thalamus, and the mediobasal hypothalamus. As could be expected from their high proliferative activity, regions surrounding the lateral and posterior recesses exhibited the highest amount of AroB/BrdU-positive cells.

It is important to mention that on many occasions, cells labeled with BrdU alone were found close to cells labeled with both BrdU and AroB. This could indicate that well-polarized radial glial cells undergo asymmetrical divisions to generate one daughter cell, which rapidly loses AroB expression. We also performed PCNA/AroB double staining in adult males and females, further indicating that AroB-labeled radial cells have mitotic activity (data not shown).

Some of the newborn cells migrate away from the ventricles

As soon as 48–72 hours after BrdU exposure (for 24 hours), BrdU-positive cells occurred more laterally, suggesting that newborn cells move away from the ventricles (Fig. 4). However, there were considerable variations in the distance covered by newborn cells. Further evidence that newborn cells migrate was provided by the fact that when PCNA/BrdU double staining was performed 15 or 30 days after BrdU exposure (for 24 or 48 hours), a large majority of BrdU-positive cells were found away from the ventricle, whereas actively dividing PCNA-positive cells are always observed adjacent to the ventricle (Fig. 4D,E). This was particularly obvious in the preoptic area, in agreement with the high proliferative activity of this region (Fig. 4E). After 15, 30, or 45 days after a 24- or 48-hour BrdU exposure, a high proportion of cells was still found near the ventricles; however, some were located much more laterally (Fig. 4A–C) and were even found at the outer brain surface (Fig. 4B). These cells did not always move laterally, but probably followed the processes of the radial cells on which they appeared to migrate. In all animals, numerous BrdU-stained cells occurred along the radial processes, possibly indicating their migratory route. Indeed, several arguments suggest that newborn cells migrate along the radial processes. First, BrdU-labeled cells and AroB-positive radial processes were often closely apposed (Fig. 4F–K), and cells exhibited a flat nucleus, a characteristic possibly indicating migration (Fig. 4F,H,K).

Second, the overall pattern of AroB-positive radial cells closely followed that of the brain nuclei. This was particularly obvious at the level of the preoptic area and thalamic region, as shown in Figure 4L–N using double staining with DAPI/AroB. One could clearly see that long radial processes oriented ventrolaterally toward the optic tract (Fig. 4L) and surrounded the cells forming the anterior part of the parvocellular preoptic nucleus (Fig. 4M,N). More dorsally, other AroB extensions were oriented laterally toward the ventrolateral thalamic nuclei (Fig. 4L–N). Between these two cell masses, there were only a few DAPI-labeled cells and virtually no AroB radial extensions.

Figure 5A–E represents camera lucida drawings of representative sections of the brain of a male 15 days after BrdU exposure for 48 hours and illustrates the potential migration pattern of the newborn cells along the radial extensions. A similar pattern was observed in all animals. On many occasions, cells seemed to be trapped between radial extensions, forming columns. This was notably the case in the lateral thalamic region and the mediobasal hypothalamus. In different regions, upon reaching the brain surface, radial processes follow the brain contour, giving the impression that AroB staining underlined the cerebral outline. This was notably the case in the preoptic area, in the ventromedial hypothalamus (Fig. 1B), and below the lateral recess (Fig. 1C). At this level, radial extensions reach the ventral surface of the brain and most likely guide the migration of the numerous BrdU cells observed at the periphery of the inferior lobes (Fig. 5E).

Fig. 1. **A–D:** Transverse sections showing AroB immunoreactivity in radial glial cells at the level of the anterior preoptic region (A), the mediobasal hypothalamus (B), the caudal lateral recess (C), and the posterior recess (D). Note the long radial processes (A–C) reaching the brain surface (C, arrowhead), which is often underlined by these processes (C, arrow). In D, note that AroB-positive cells of the NRP have a short cytoplasmic process (arrowhead) extending to the posterior recess (PR). **E–G:** Triple labeling (AroB in red, Acetyl-Tub in green, and DAPI in blue) in the ventral telencephalon (E), around the lateral recess (F), and in the ventral hypothalamus (G) showing that AroB immunoreactivity is restricted to radial glial cells bordering the ventricles and that the marker of postmitotic neurons Acetyl-Tub is found in cells adjacent to the radial cells. **H–J:** Confocal micrographs showing that the Acetyl-Tub staining (H) never overlaps with that of AroB-positive cells (I). Note that there is no overlap of the two signals as shown by the absence of yellow structures (J). **K–M:** Interferential contrast micrographs showing examples of BrdU-positive cells (arrowheads) in the caudal part of the ventral telencephalon (K), the preoptic region (L), and the ventral hypothalamus (M). Note that all labeled cells are located just adjacent to the ventricles. For abbreviations, see list. Scale bar = 35 μm in A; 70 μm in B,C; 20 μm in D,F; 15 μm in E; 10 μm in G–J; 50 μm in K–M.

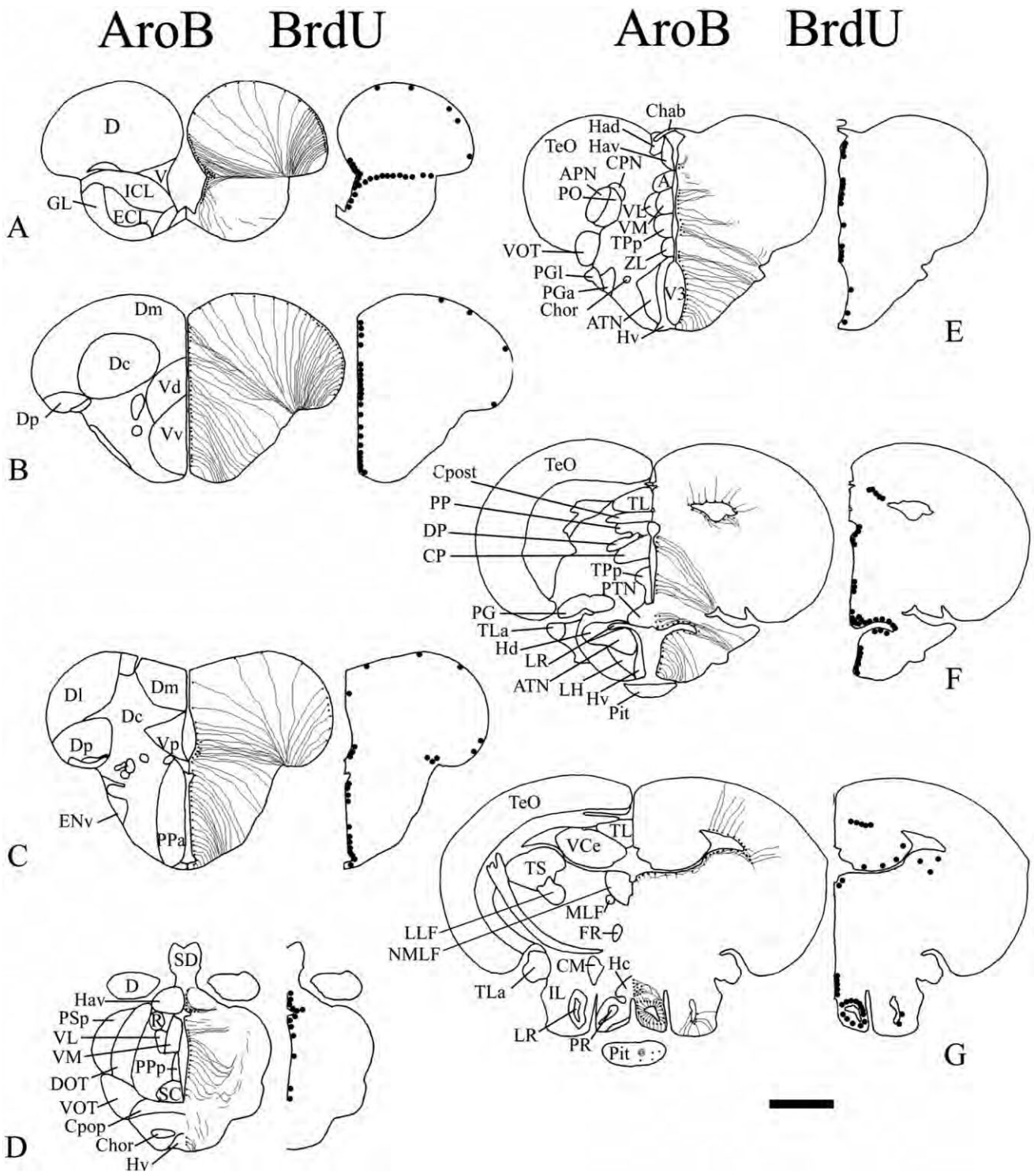


Fig. 2. **A–G:** Comparative distribution of radial glial cells, as labeled with AroB antibodies, and that of BrdU-positive cells in the forebrain of fish exposed for 24 hours to BrdU and sacrificed at the end of treatment. The left side shows representative sections taken from the zebrafish brain atlas by Wullimann et al. (1996) at cross sections 50 (A), 71 (B), 98 (C), 125 (D), 136 (E), 153 (F), and 173 (G). The distribution of AroB radial cells and their projection pattern are those reported in Menuet et al. (2005) and are shown for comparative purposes. The distribution of BrdU-labeled cells is based on observations of six animals (three males and three females). Scale bar = 250 μm in A–G.

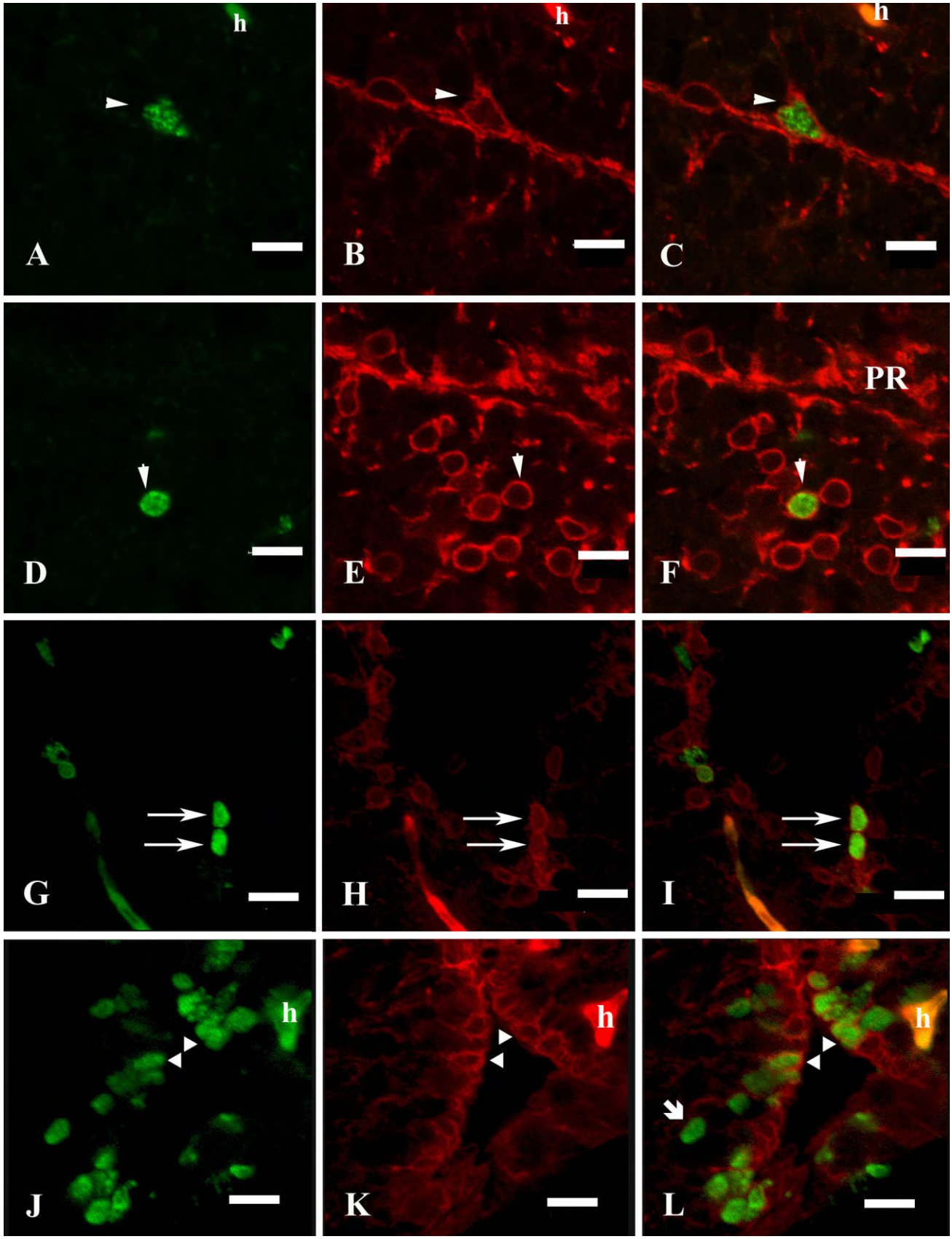


Fig. 3. Confocal microscope pictures of transverse sections showing that part of the AroB-labeled radial glial cells exhibit a BrdU-positive nucleus. **A–C:** Dorsal subpallium of an animal treated with BrdU for 24 hours and sacrificed at the end of the treatment showing an AroB-stained (B, arrow) cell clearly exhibiting a BrdU-positive nucleus (A). C shows the superposition of A and B. **D–F:** AroB-positive cell (E, arrow), located near the posterior recess (PR), having a BrdU-labeled nucleus (D). Such cells (F), found in an animal treated with BrdU for 24 hours and sacrificed at the end of the treatment, were abundant at this level. **G–I:** AroB-positive cells with a BrdU-stained nucleus in the preoptic area in an animal treated with BrdU for 48 hours and sacrificed at 5 days after beginning the treatment. **J–L:** AroB-positive cells with BrdU-labeled nuclei (arrowheads) in the anterior hypothalamus of an animal treated with BrdU for 48 hours and sacrificed at 5 days after beginning the treatment. AroB-negative/BrdU-positive cells are also observed lateral to the ependymal layer (arrow). h, blood cells. Scale bar = 8 μm in A–F; 16 μm in G –I; 10 μm in J–L.

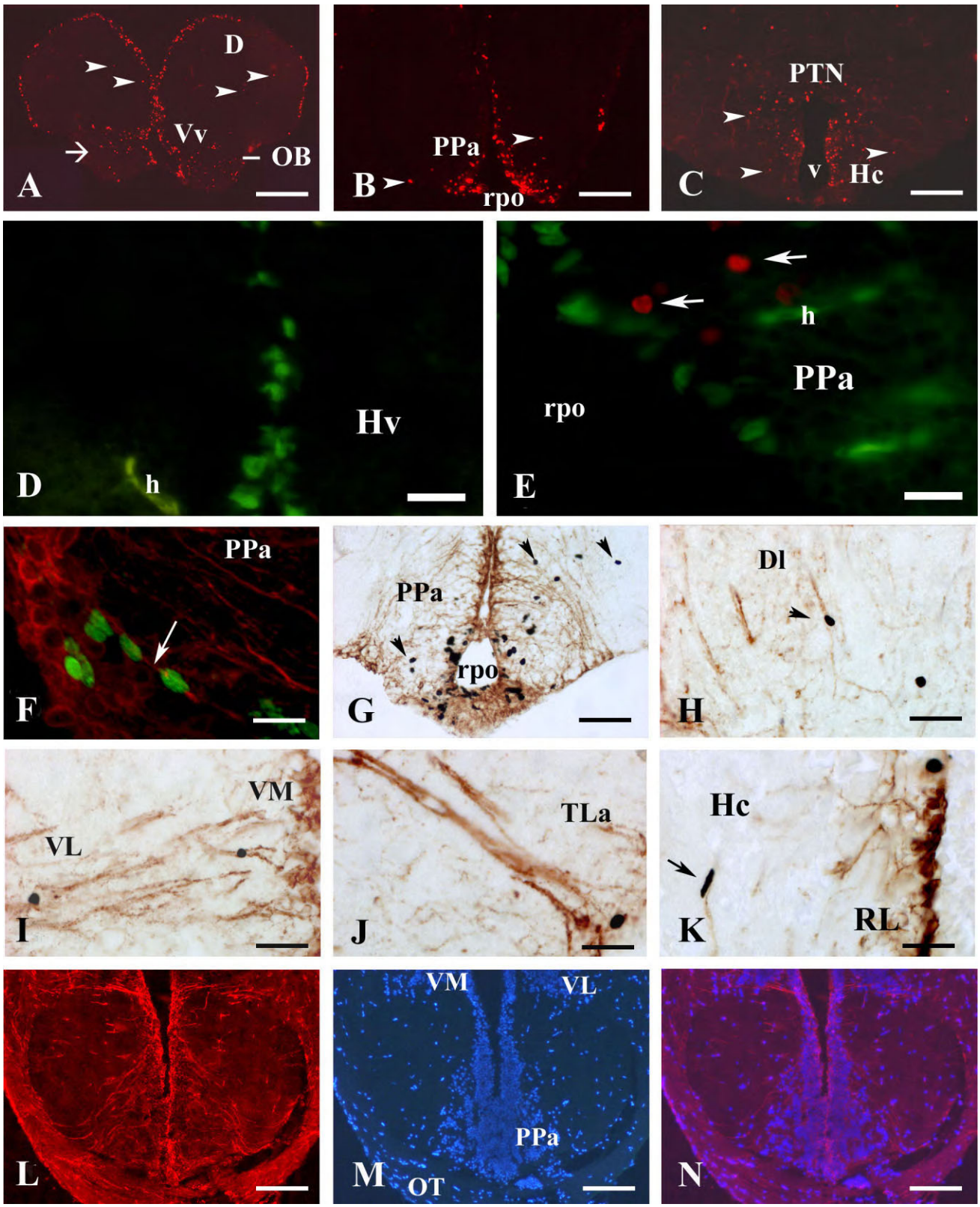

D
Vv
OB
A
PPa
B
rpo
PTN
C
V
Hc
Hv
D
h
h
PPa
rpo
E
PPa
F
PPa
rpo
G
Dl
H
VM
VL
I
TLa
J
Hc
K
RL
L
VM
VL
PPa
M
OT
N

Figure 4

Some of the newly generated cells self-renew

Whereas some of the newborn cells appeared to migrate away from their birth place, others appeared to undergo further divisions in the subventricular layer. Indeed, following double staining with BrdU (24 or 48 hours of exposure with sacrifice at 15, 30, and 45 days) and PCNA, a marker of dividing cells, we found that a substantial subset of PCNA-labeled cells located close to the ventricular surface were also BrdU positive. Such self-renewing cells were particularly numerous in the anterior subpallium (Fig. 6A–C), the preoptic area (Fig. 6D–F), and the regions surrounding the lateral and posterior recesses. Indirect evidence that BrdU-labeled cells may cycle is also provided by the fact that at later times after BrdU exposure, the intensity of the staining in some of the labeled cells was much lower compared with cells from animals sampled at earlier times after BrdU exposure, in which staining is strong and homogenous.

Newly generated cells differentiate into neurons

Although we do not know whether all cells undergo one or several divisions before leaving the periventricular zone, a high number of BrdU-labeled cells differentiate into neurons. This was demonstrated by performing double staining with BrdU and two neuronal markers, the protein Hu and Acetyl-Tub. Observations were made either with a photomicroscope or a confocal microscope (Figs. 6, 7). At 15, 30, and 45 days after short BrdU exposure, we found evidence of many Hu-positive nuclei also exhibiting BrdU immunoreactivity (Fig. 6G–L) or cells with an Acetyl-Tub-positive cytoplasm and a BrdU-labeled nucleus (Fig. 7A–J). Such new neurons were found in many regions of the forebrain either in proximity to the ventricles, for example, in the preoptic area (Fig. 7A) or in the pallium (Fig. 7B–D), where numerous Acetyl-Tub positive neurons were found just adjacent to the ventricular layer. In contrast, new neurons occurred far from the ventricles, sometimes close to the outer surface of the brain, for example, in the torus lateralis or around the nucleus diffusus lobi inferioris. These new neurons seem to have well-defined nuclei after migration according to the above-mentioned itineraries; probably all newly generated neurons within a given structure arise from a similar progenitor periventricular zone. Of course, we cannot claim that all newborn cells differentiated into neurons as assessed by Hu or Acetyl-Tub staining, but a large majority of the BrdU-positive cells after 30, 45, or 60 days were positive for one of these markers. Whether newborn cells differentiate into glial cells, other than radial cells, is unknown, as we did not have suitable markers.

Fig. 4. **A–C:** Transverse sections at the level of the telencephalon (A), preoptic area (B), and mediobasal hypothalamus (C) of animals treated with BrdU for 48 hours and sacrificed 15 days (A, B) or 45 days (C) after beginning the treatment. Note the abundance of BrdU-positive cells close to the ventricles but also that of cells located away from the periventricular proliferative areas (arrowheads). Note in A the presence of numerous positive cells (arrow) in the olfactory bulbs (OB). **D:** Transverse section in the mediobasal hypothalamus (Hv) showing numerous PCNA-positive cells bordering the third ventricle. **E:** Double staining for PCNA/BrdU 15 days after BrdU treatment for 48 hours showing that some BrdU-labeled cells (in red) in the preoptic area are found away from the preoptic recess, whereas PCNA-labeled cells (in green) are always observed along the ventricle (h points to red blood cells). **F:** Confocal micrograph showing the preoptic region of an animal treated with BrdU for 24 hours and sacrificed at 5 days and demonstrating the presence of several flattened BrdU-labeled nuclei (green) closely apposed to an AroB-positive (red) radial process (arrow). **G:** Double staining AroB (brown) and BrdU (black) in the preoptic region of an animal sacrificed after 8 days showing that some BrdU-labeled cells (arrowheads) have already migrated quite laterally. **H–K:** Double staining AroB (brown) and BrdU (black) 15 days after BrdU treatment in the lateral pallium (Dl), the ventrolateral thalamic region (VL), the torus lateralis (TLa), and the caudal hypothalamus showing BrdU-labeled nuclei (arrow) closely associated with AroB-positive processes. Note in F, H, and K that the BrdU-labeled nuclei appear flattened. **L–N:** AroB staining (L), DAPI staining (M), and the combination of the two (N), showing the AroB radial processes surrounding the densely packed cells of the parvocellular preoptic nucleus and, more dorsally, the radial processes of cells in the ventromedial thalamus reaching the heavily populated ventrolateral thalamus. For abbreviations, see list. Scale bar = 150 μm in A; 100 μm in B,C,L–N; 10 μm in D,E; 8 μm in F; 50 μm in G; 25 μm in H–K.

DISCUSSION

The present data provide further information on the cellular mechanisms of neurogenesis in the brain of adult fish. This study, performed on 6–10-month-old sexually active fish, confirms the occurrence of several proliferation regions in the brain of adults as previously reported in stickleback, brown ghost, and zebrafish (Zupanc and Horschke, 1995; Ekström et al., 2001; Zupanc et al., 2005; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006) and provides further information on the migration and neuronal differentiation of the newborn cells. In addition, the present data emphasize the role of radial glial cells, known largely for persisting in the brain of adult fish, in generating new cells and probably guiding them to their place of destination, where they will differentiate into neurons. In mammals, adult neurogenesis is well recognized in two brain regions, one of which is the subventricular layer of the lateral ventricle, which gives birth to new cells that migrate via the rostral migratory stream to the olfactory bulbs where they differentiate into inhibitory interneurons (Lois and Alvarez-Buylla, 1994; Carleton et al., 2002). The second neurogenic region is the subgranular zone of the dentate gyrus in which astrocytes give birth to new granular neurons (Seri et al., 2001; Christie and Cameron, 2006). The molecular and cellular mechanisms of adult neurogenesis differ slightly between these two neurogenic regions (Merkle et al., 2004; Mori et al., 2005; Lledo et al., 2006), but none of the current models appear to be valid in adult teleost fish, in which, in contrast to mammals, radial glial cells persist in the brain (Onteniente et al., 1983; Arochena et al., 2004).

Aromatase B is a good marker of radial glial cells in the forebrain of adult fish

We and others have shown that the high aromatase activity in the brain of fish is correlated with strong expression of the *cyp19b* gene, encoding AroB, which is only detected in the radial glial cells. This was demonstrated in the plainfin midshipman, the rainbow trout, and the zebrafish by both in situ hybridization and immunohistochemistry (Forlano et al., 2001; Menuet et al., 2003, 2005). In the midshipman, it was shown that AroB partially colocalizes with GFAP and, in the trout, a strong coex-

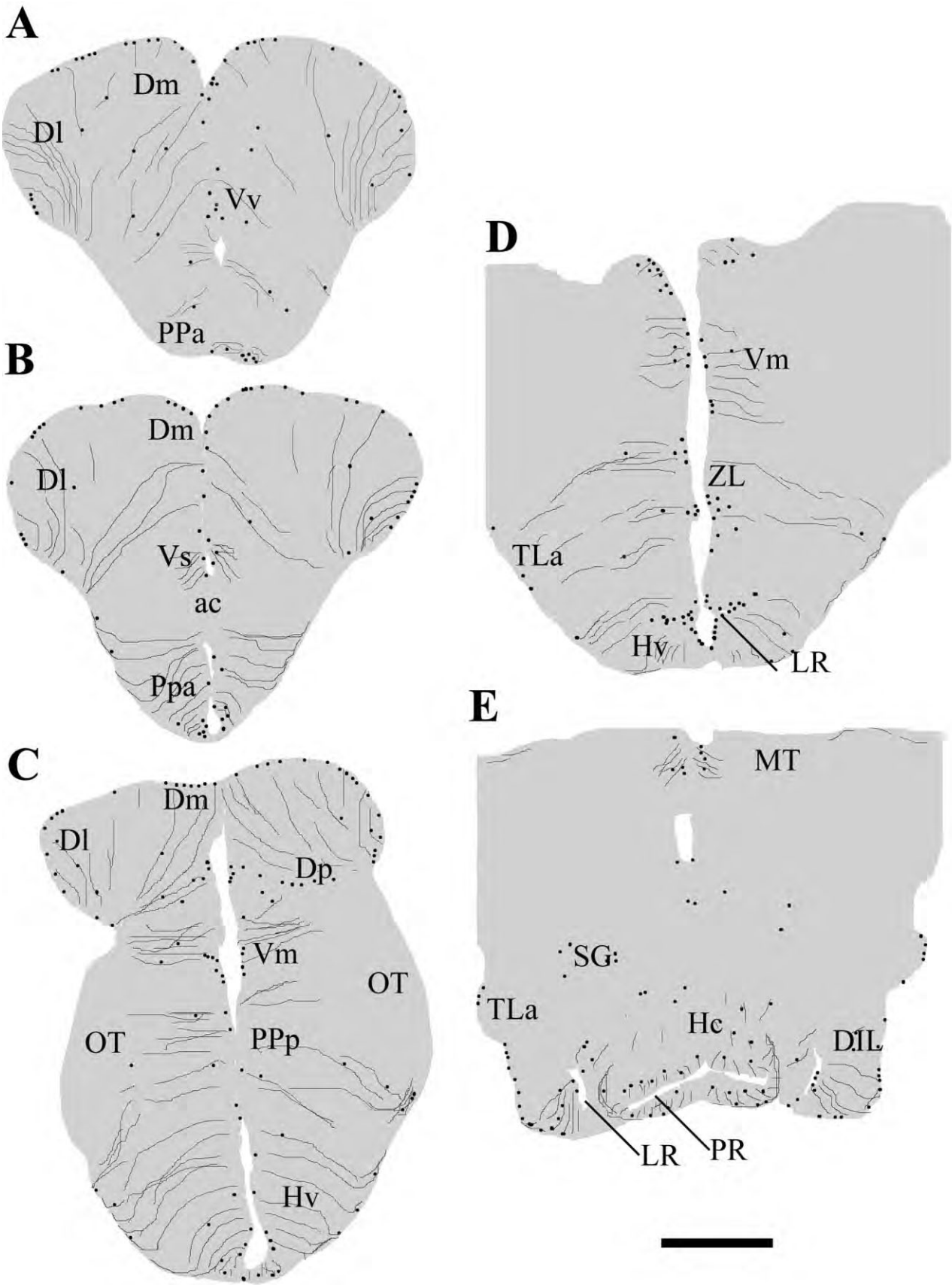


Fig. 5. **A–E:** Camera lucida drawings of a representative male showing the respective distribution of AroB-positive radial processes (lines) and that of BrdU-labeled cells (dots) 15 days after a 48-hour exposure. Similar observations were made in other animals suggesting that this is representative of the general migration pattern. For abbreviations, see list. Scale bar = 300 μm.

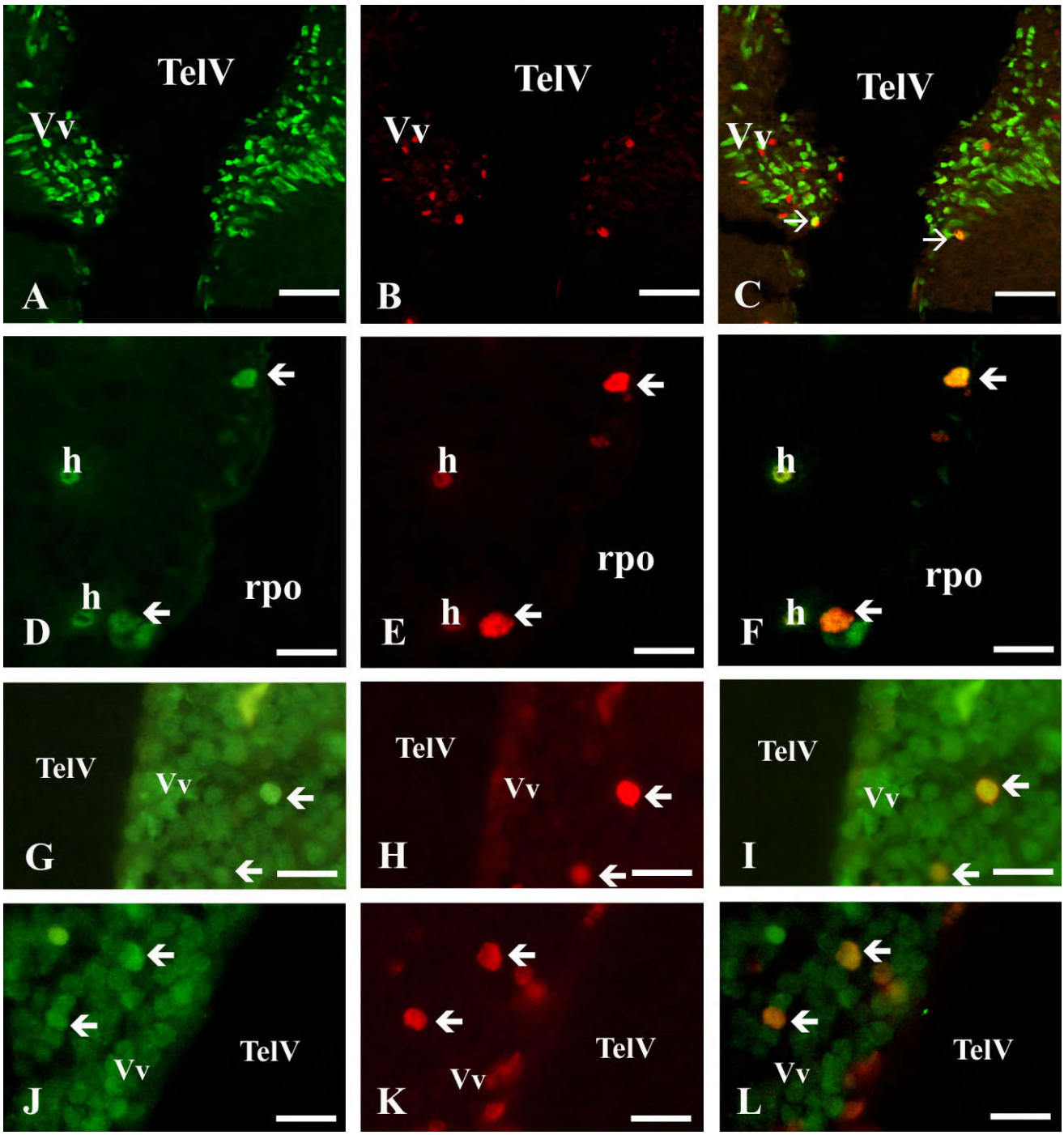


Fig. 6. **A–C:** Confocal micrographs showing double staining for PCNA (green) and BrdU (red) in the ventral subpallium (Vv) in a female sacrificed 30 days after BrdU treatment for 2 days. Note the active proliferation in this area, as indicated by PCNA (A) and the fact that the number of BrdU-positive cells (B) is much lower, suggesting that most BrdU-positive cells have left this area. Also note that a few cells are labeled by both markers (arrows in C). **D–F:** Confocal micrographs showing cells labeled by both PCNA and BrdU in the preoptic area of a male sacrificed 30 days after BrdU treatment (h points to blood cells). **G–L:** Dorsal subpallium of a female 30 days after BrdU treatment: two examples of Hu-positive cells (green G and J) also showing BrdU immunoreactivity (red in H and K), as indicated by the yellow color in I and L. For abbreviations, see list. Scale bar = 40 μm in A–C; 8 μm in D–L.

presssion of AroB with the protein S-100 was reported (Pellegrini et al., 2005). In the zebrafish, we found coexpression of AroB and GFAP or vimentin only in the long radial processes of the preoptic area, whereas S-100 staining was weak in this species (data not shown). Previous studies using the neuronal marker Hu demonstrated that

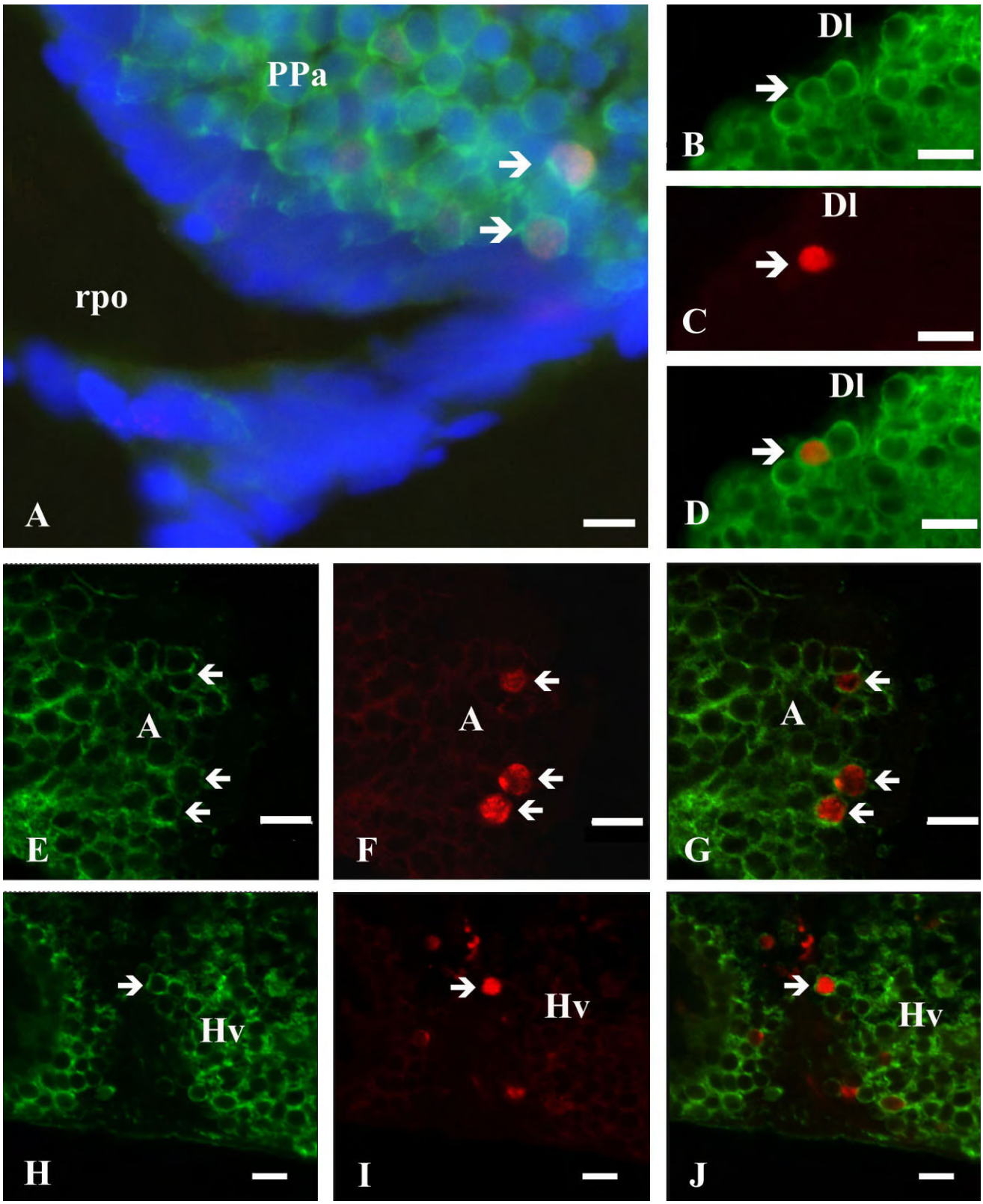


Fig. 7. **A:** Photomicrograph taken in the anterior parvocellular preoptic nucleus (PPa) of a male 15 days after BrdU treatment and showing that two Acetyl-Tub-positive cells (cytoplasm labeled in green) exhibit a BrdU-immunoreactive nucleus (arrows). DAPI counterstaining (in blue) shows that the periventricular layer, bordering the preoptic recess (rpo), is devoid of both BrdU and Acetyl-Tub staining and that newborn BrdU cells differentiated into Acetyl-Tub neurons in the immediate vicinity of the ependymal layer. **B–J:** Examples (arrows) of Acetyl-Tub-positive cells (green cytoplasm; B,E,H) exhibiting a positive red nucleus labeled by BrdU (C,F,I) in the lateral pallium (Dl in B,C,D), the anterior thalamic region (A in E,F,G) and the mediobasal hypothalamus (Hv in H,I,J). All pictures were taken from males 30 days after BrdU treatment. Scale bar = 6 μm in A; 8 μm in B–G; 7 μm in H–J.

AroB is not expressed in neurons (Forlano et al., 2001), which we confirmed here by using both Hu (data not shown) and Acetyl-Tub immunohistochemistry.

We show that AroB and the postmitotic neuronal marker Acetyl-Tub (Chitnis and Kuwada, 1990; Huang and Sato, 1998) are never coexpressed. Furthermore, triple staining with DAPI/AroB/Acetyl-Tub tended to indicate that in the periventricular regions where AroB expression was the highest (the anterior preoptic area and mediobasal hypothalamus), virtually all cells were either stained by AroB or by Acetyl-Tub, because we see few cells not stained by either marker. The lack of efficient radial glial markers in fish is problematic and has slowed progress on the role of such cells even during embryogenesis. The physiological significance for the expression of AroB in radial glial cells is still subject to speculation (see below), but it is clear that AroB is a good marker of radial cells, especially in the forebrain of adult teleosts. It must, however, be pointed out that anti-AroB does not label all radial cells. In some regions (the ventral and dorsal subpallium, anterior ventral preoptic area, thalamus, and mediobasal hypothalamus), AroB-positive cells appeared to cover the entire ependymal surface, leaving little space for negative cells, whereas, in other regions there were few AroB-positive cells. Thus, AroB cannot be considered the ultimate radial cell marker.

Active proliferation in the forebrain of zebrafish

Even though the brain of fish has long been known to continue growing during adulthood (Kranz and Richter, 1970a,b; Zupanc and Zupanc, 1992; Zupanc and Horschke, 1995), it is only recently that the underlying mechanisms have attracted attention (Zupanc and Horschke, 1995; Zupanc, 2006). Using BrdU immunohistochemistry, several studies described a number of periventricular proliferative zones, which appear to be conserved among teleost species, as could be expected (Ekström et al., 2001; Zupanc et al., 2005; Grandel et al., 2006). Our results with BrdU and PCNA staining totally confirmed results from previous studies and showed extensive proliferation in the subpallial and pallial regions, corresponding to the ventral and dorsal telencephalon, respectively. However, due to the development of the telencephalon by eversion, teleosts have a unique median telencephalic ventricle, which is closed dorsally by the tela choroida. Our results fully confirmed previous studies showing that the pallium and subpallium exhibit a high proliferative activity that is maximal in the anterior ventral subpallium and the caudal pallium. Active proliferative zones were further detected in the anterior preoptic, thalamic, habenular, and hypothalamic regions, again confirming previous observations in zebrafish (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006) and stickleback (Ekström et al., 2001). In contrast, few BrdU-labeled cells were detected in the olfactory bulbs after a short survival time, which was also in agreement with other reports (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). It must be pointed out that after short survival times, BrdU-labeled cells in the forebrain are always found within the ependymal layer or in its close proximity (one or two cell diameter).

AroB-positive radial glial cells are progenitor cells

Until now, the identity of the proliferating cells in teleost fish has not been reported, although it has been suggested that radial cells could be these precursors (Zupanc and Horschke, 1995). The present study shows for the first time that those radial glial cells have mitotic activity and represent progenitors or precursor cells in adult fish. When animals were sacrificed immediately after 12 or 24 hours of exposure to BrdU, a large majority (possibly all in areas with high density of AroB-radial cells) of the BrdU-positive cells were also AroB immunoreactive. At longer survival times (48 hours and longer) the percentage of BrdU/AroB-labeled cells decreased, probably reflecting the generation of daughter cells that rapidly lose AroB expression but retain BrdU labeling. Given the morphology of radial cells and their long radial processes, it is likely that they undergo asymmetrical divisions in a way similar to that reported during mammalian embryonic neurogenesis (Noctor et al., 2001, 2002; Mori et al., 2005), although this remains to be firmly established by using live imaging methods. Nevertheless, we found numerous examples of radial cells having incorporated BrdU in most proliferative regions, and in general there was a good correlation between the amount of AroB radial cells and that of BrdU-labeled cells in the telencephalon and the diencephalon. In addition, we also found substantial evidence that PCNA-labeled nuclei along the ventricles corresponded to AroB-positive cells, further demonstrating that radial cells divide.

Nevertheless, we also found numerous examples of BrdU-labeled cells that did not express AroB in the forebrain and in other brain regions. For example, in the medial and dorsal pallium, only a few of the numerous BrdU-labeled cells were immunoreactive for AroB. We do not know whether these AroB-negative cells are radial cells that do not express AroB or another cell type. A recent study attempted to characterize molecular markers of the progenitor cells in zebrafish and showed that 42% of the BrdU-positive cells in the telencephalon were also positive for FABP7a, one of two brain lipid binding protein (BLBP) genes in zebrafish (Adolf et al., 2006). BLBP is a well-established glial marker in mammals and birds, and thus this observation is consistent with our observation that progenitor cells are radial glial cells.

Although the present results advance our understanding of neurogenesis in adult fish, at the present stage we can only speculate with respect to the precise scenario(s) of glial cell division. For example, we do not know how many times a radial cell divides, what the interval is, or what the fate of the daughter cells is. We suggest that radial glial cells perform asymmetrical divisions yielding a radial cell and a progenitor daughter cell. Whether this daughter cell immediately migrates and differentiates into a neuron or undergoes one or several round(s) of division remains to be demonstrated. This latter hypothesis is supported by our data confirming previous reports showing that, after long survival times, some BrdU-labeled cells are also stained by PCNA, indicating that they divide further.

Radial and tangential migration of the newborn cells in the telencephalon and diencephalon

We report that many BrdU-positive cells appear to leave the proliferative areas within a few days after BrdU in-

corporation, indicating that they move away from the ventricles. This confirms previous studies in zebrafish (Zupanc and Horschke, 1995; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006), but, in addition, the precise description of the AroB-radial processes provides clues as to where the newborn cells could migrate. Our double AroB-BrdU staining strongly suggests that in most cases newborn cells migrate radially, most likely along the radial processes, as already suggested (Zupanc and Horschke, 1995). We indeed found numerous cells with flattened BrdU nuclei closely apposed to AroB-positive radial processes similar to those reported on GFAP processes in the cerebellum of the brown ghost (Zupanc and Horschke, 1995). Attempts to label those potentially migrating neurons with antibodies to doublecortin have failed, and thus we do not have conclusive evidence that such cells indeed migrate along the radial processes, but it is most likely to be the case. It is clear from Figure 5 that the distance covered by the newborn cells varies considerably from one brain region to the other and within the same region from one cell to the other. For example, most newborn cells in the pallial region remained close to their birth place (a few cell diameters).

In contrast, in other regions such as the lateral thalamus, the ventromedial hypothalamus, or the inferior lobes, BrdU-stained cells appeared to migrate quite laterally, sometimes to the outer brain surface. In the diencephalon, we also found numerous BrdU-labeled cells that appeared to migrate. In the anterior ventral preoptic area, the involvement of radial glia in the growth of the anterior parvocellular preoptic nucleus is quite obvious when one sees the remarkable similarity between the distribution of DAPI-labeled cells and that of the AroB radial processes. Indeed, the extensions from radial cells of the anterior preoptic nucleus appeared somehow to surround the area covered by the densely packed DAPI-stained nuclei. This suggests that the final localization of a newborn cell will depend on its departure point; cells leaving dorsally probably migrate more laterally than those born ventrally (see Fig. 7A). In the ventral subpallium, where proliferative activity is extremely high, most newborn cells appeared to migrate quite rapidly because after 15 days all BrdU-labeled cells left this region, whereas active proliferation was still evident by strong PCNA staining.

It has been suggested that newborn cells in this region tangentially migrate into the olfactory bulbs according to a pathway that would be homologous to the rostral migratory stream in mammals (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). This assumption is based on the fact that short BrdU exposure failed to label newborn cells in the olfactory bulbs, which is confirmed by the present study, whereas, over time, BrdU-labeled cells appeared to colonize the bulbs where they would eventually differentiate into glutamic acid decarboxylase (GAD)- and tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons (Adolf et al., 2006). These olfactory progenitors would migrate tangentially according to a polysialic acid-NCAM neural cell adhesion molecule migratory pathway (PSA-NCAM) (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006), which does not appear to involve AroB-positive radial cells. Our results suggest that the origin of these olfactory progenitors is the anterior subpallium where active proliferation takes place and where BrdU-labeled cells disappear rapidly and appear progressively in the olfactory bulbs.

Many newborn cells differentiate into neurons

Whereas many of the newborn cells appear to move away from the ventricles, as described above, others remain in proximity to their birth place. We cannot exclude the possibility that some of these newborn cells remaining near the ventricle differentiate into radial cells or another glial cell type. This will have to be investigated. However, from our observations, migrating newborn cells rapidly lose AroB expression, because we never observed AroB-positive cells away from the ventricles. On another hand, based on our Acetyl-Tub/BrdU double staining, it is clear that many BrdU-positive cells rapidly differentiate into neurons. This observation is in agreement with the fact that BrdU-labeled cells become Hu positive (Zupanc et al., 2005; Grandel et al., 2006), as was also observed in this study. Such Acetyl-Tub/BrdU or Hu/BrdU cells were found in many different forebrain regions but were particularly numerous in the dorsal and lateral pallium, the subpallium, the preoptic area, the thalamus, and the mediobasal hypothalamus.

Whether the newborn cells differentiate before, during, or after migration remains unknown. In the medial and dorsal pallial regions, most BrdU-labeled cells remained close to the periventricular layer, and we found that most of these cells became Acetyl-Tub or Hu positive after 2 weeks. Nevertheless, we also observed a few Acetyl-Tub/BrdU-labeled cells in deeper regions of the pallium. In the preoptic nucleus, many Acetyl-Tub/BrdU cells were observed. This nucleus is a well-known hypophysiotropic nucleus (Anglade et al., 1993) and a major estrogen target (Pellegrini et al., 2005). It will be interesting in future studies to identify the phenotype of these new cells and the potential role of AroB in this structure, which has not been documented so far apart from some TH-immunoreactive neurons (Grandel et al., 2006). Some studies have indicated the phenotype of the newborn neurons in the olfactory bulbs (TH and GAD), posterior tuberculum (TH), pretectum (TH), and hypothalamus (serotonin and TH) of zebrafish (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). However, clearly much work will be needed to identify the phenotype of these newborn neurons and their integration in existing or new circuits.

What is the functional significance of aromatase expression in progenitor cells?

Because of its considerable growth throughout adulthood, it is conceivable that the brain of fish requires active neurogenesis at all steps of the life cycle, and recent studies have started to decipher the underlying cellular and molecular mechanisms of this fascinating phenomenon (Zupanc and Horschke, 1995; Ekström et al., 2001; Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). However, what remains intriguing is the unique and spectacular expression of AroB in the radial glial cells, especially in the forebrain (Forlano et al., 2001). The reasons for the high expression of AroB in sexually mature adults seems to be the existence of a positive autoregulatory loop of the *cyp19b* gene requiring the integrity of an ERE sequence on the AroB promoter and involving estrogen receptors together with an unknown glial or neuroglial specific factor (Menuet et al., 2005). Although this partly explains the presence of AroB in radial cells of fish, it certainly does not provide any explanation as to the functions of aromatase in those

cells. In mammals and birds, under normal conditions, aromatase is expressed in discrete neuronal populations mainly in the forebrain (Balthazart and Ball, 1998). However, under certain circumstances, it is known that aromatase is expressed in astrocytes in vitro (Zwain and Yen, 1999; Zwain et al., 1997), notably under stressful conditions such as serum deprivation (Azcoitia et al., 2003). In vivo, after mechanical or chemical lesions in rat or bird, aromatase is de novo expressed in reactive astrocytes around the lesions (Azcoitia et al., 1999; Peterson et al., 2004). Furthermore, a recent study in zebra finch demonstrated that radial glial cells, facing a chemical lesion of the cortex, express aromatase de novo (Peterson et al., 2004).

These data strongly suggest that injury-dependent upregulation of aromatase in astrocytes and thus the local production of estrogens are part of the initial mechanisms used by the brain to cope with brain repair (Garcia-Segura et al., 1999a,b, 2001; Garcia-Ovejero et al., 2002). These data have stimulated hopes regarding the development of new strategies to prevent neurodegeneration (Azcoitia et al., 2005). In addition, there is ample evidence that estradiol is neuroprotective in the brain, and substantial experimental evidence from studies of laboratory animals suggests that sex steroids are key players in determining stroke sensitivity, i.e., outcome when an ischemic insult occurs (Behl, 2002, 2005; McCullough and Hurn, 2003; Wise et al., 2005). It is known that high concentrations of estrogens are endowed with antioxidative properties, but classical genomic or alternative rapid nongenomic responses are also involved in the neuroprotective effects of estrogen against amyloid peptide toxicity.

On another hand, there are some lines of evidence suggesting that the hormonal milieu can impact adult neurogenesis (Korbonits et al., 2004). In particular, adrenal corticosteroids exert an inhibitory action on neurogenesis, as shown by the fact that stress causes atrophy of CA3 pyramidal cell dendrites, inhibits adult neurogenesis in the dentate gyrus, and impairs hippocampus-dependent learning (Karten et al., 2005). In contrast, gonadal hormones, in particular estrogens, appear to exert a stimulatory effect on neoneurogenesis, as shown by the fact that estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of adult female rat (Tanapat et al., 1999). However, information on the neurotrophic and neuroprotective effects of estrogens on adult neurogenesis in vivo is limited and controversial. For example, cell proliferation in the hippocampus is lower in female voles when estradiol levels are high (Ormerod and Galea, 2003; Ormerod et al., 2004).

Other studies in rat have shown that estradiol initially enhances, but subsequently suppresses granule cell proliferation in the dentate gyrus via adrenal steroids (Ormerod et al., 2003). In songbirds, evidence that neurogenesis and neuronal recruitment is sensitive to experience and environmental cues has been provided in detail: recruitment of new neurons has been clearly shown to be seasonally and hormonally regulated (Brainard and Doupe, 2001). All these data suggest that, given its neurotrophic and neuroprotective effects, estradiol produced in radial glial cells would be ideally placed to modulate the neurogenic activity of these cells.

In conclusion, the present study further documents two unique features of the fish brain that are probably linked to each other, active neurogenesis and the presence of aromatase in radial glial cells, which appear to be progenitor cells in the brain of adult fish. This study suggests that radial cells give birth to neurons by using the radial process to migrate before differentiating into neurons, a mechanism similar to what has been observed in mammals during embryonic neurogenesis (Noctor et al., 2001, 2002; Mori et al., 2005). Thus, the adult brain of fish exhibits properties of the mammalian or bird embryonic brain. It must be pointed out that similar mechanisms involving Müller glia, a type of radial glia present in all vertebrate retinas, were recently reported in the context of retinal regeneration. Indeed, recent studies indicate that following retinal injury, Müller glial cells progress through the cell cycle and ultimately produce new retinal cells outside the lesion sites (Yurco and Cameron, 2005).

In addition, the present study and others also suggest that at least some of the newborn cells retain label and renew themselves, which are two criteria of neural stem cells (Zupanc et al., 2005; Grandel et al., 2006). The brain of adult fish thus appears to be a unique and promising model for exploration of the role of sexual steroids in neurogenesis and brain repair.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Roselyne Primault (Département de Microscopie, Université de Rennes 1) for her invaluable help with the Leica TCS NT confocal microscopy. We thank Dr. Fiona Francis for her kind gift of the doublecortin antibody. Thanks are due to Dr. Nadia Soussi-Yanicostas for helpful suggestions.

LITERATURE CITED

Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tannhauser B, Strahle U, Gotz M, Bally-Cuif L. 2006. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. Dev Biol 295:278–293.

Alvarez-Buylla A, Lim DA. 2004. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. Neuron 41:683–686.

Alvarez-Buylla A, Buskirk DR, Nottebohm F. 1987. Monoclonal antibody reveals radial glia in adult avian brain. J Comp Neurol 264:159–170.

Anglade I, Zandbergen AM, Kah O. 1993. Origin of the pituitary innervation in the goldfish. Cell Tissue Res 273: 345–355.

Arochena M, Anadon R, Diaz-Regueira SM. 2004. Development of vimentin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in the brain of gray mullet (*Chelon labrosus*), an advanced teleost. J Comp Neurol 469:413–436.

Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. 1999. Localization of estrogen receptor beta-immunoreactivity in astrocytes of the adult rat brain. Glia 26:260–267.

Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Garcia-Segura LM. 2003. Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective. Ann N Y Acad Sci 1007: 298–305.

Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Garcia-Segura LM. 2005. Brain steroidogenesis: emerging therapeutic strategies to prevent neurodegeneration. J Neural Transm 112:171–176.

Balthazart J, Ball GF. 1998. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). Trends Neurosci 21:243–249.

Bang PI, Sewell WF, Malicki JJ. 2001. Morphology and cell type heterogeneities of the inner ear epithelia in adult and juvenile zebrafish (*Danio rerio*). J Comp Neurol 438:173–190.

Behl C. 2002. Oestrogen as a neuroprotective hormone. Nat Rev Neurosci 3:433–442.

Behl C. 2005. Oxidative stress in Alzheimer's disease: implications for prevention and therapy. Subcell Biochem 38:65–78.

Brainard MS, Doupe AJ. 2001. Postlearning consolidation of birdsong: stabilizing effects of age and anterior forebrain lesions. J Neurosci 21:2501–2517.

Carleton A, Rochefort C, Morante-Oria J, Desmaisons D, Vincent JD,

Gheusi G, Lledo PM. 2002. Making scents of olfactory neurogenesis. J Physiol Paris 96:115–122.

Chitnis AB, Kuwada JY. 1990. Axonogenesis in the brain of zebrafish embryos. J Neurosci 10:1892–1905.

Christie BR, Cameron HA. 2006. Neurogenesis in the adult hippocampus. Hippocampus 16:199–207.

Ekström P, Johnsson CM, Ohlin LM. 2001. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. J Comp Neurol 436:92–110.

Ever L, Gaiano N. 2005. Radial 'glial' progenitors: neurogenesis and signaling. Curr Opin Neurobiol 15:29–33.

Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass AH. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. J Neurosci 21:8943–8955.

Garcia-Ovejero D, Veiga S, Garcia-Segura LM, Doncarlos LL. 2002. Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. J Comp Neurol 450:256–271.

Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA. 1999a. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. J Neurobiol 40:574–584.

Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. 1999b. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. Neuroscience 89:567–578.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. Prog Neurobiol 63:29–60.

Gotz M. 2003. Glial cells generate neurons—master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. Neuroscientist 9:379–397.

Gotz M, Barde YA. 2005. Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. Neuron 46:369–372.

Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. Dev Biol 295:263–277.

Henion PD, Raible DW, Beattie CE, Stoesser KL, Weston JA, Eisen JS. 1996. Screen for mutations affecting development of zebrafish neural crest. Dev Genet 18:11–17.

Huang S, Sato S. 1998. Progenitor cells in the adult zebrafish nervous system express a Brn-1-related POU gene, tai-ji. Mech Dev 71:23–35.

Karten YJ, Olariu A, Cameron HA. 2005. Stress in early life inhibits neurogenesis in adulthood. Trends Neurosci 28:171–172.

Kishida M, Callard GV. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. Endocrinology 142:740–750.

Korbonits M, Morris DG, Nanzer A, Kola B, Grossman AB. 2004. Role of regulatory factors in pituitary tumour formation. Front Horm Res 32:63–95.

Kranz D, Richter W. 1970a. Autoradiographische Untersuchungen über die Lokalisation der Matrixzonen des Diencephalons von juvenilen und adulten *Lebistes reticulatus* (Teleostei). Z Mikrosk-Anat Forsch 82:42–66.

Kranz D, Richter W. 1970b. Autoradiographische Untersuchungen zur DNS-Synthese im Cerebellum und in der Medulla oblongata von Teleostiern verschiedenen Lebensalters. Z Mikrosk-Anat Forsch 82:264–292.

Kwon YK. 2002. Effect of neurotrophic factors on neuronal stem cell death. J Biochem Mol Biol 35:87–93.

Lephart ED. 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. Brain Res Brain Res Rev 22:1–26.

Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. Nat Rev Neurosci 7:179–193.

Lois C, Alvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. Science 264:1145–1148.

Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. Development 127:5253–5263.

McCullough LD, Hurn PD. 2003. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. Trends Endocrinol Metab 14:228–235.

Menuet A, Anglade I, Le Guevel R, Pellegrini E, Pakdel F, Kah O. 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: comparison with estrogen receptor alpha. J Comp Neurol 462:180–193.

Menuet A, Pellegrini E, Brion F, Gueguen MM, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. J Comp Neurol 485:304–320.

Merkle FT, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2004. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. Proc Natl Acad Sci U S A 101:17528–17532.

Mori T, Buffo A, Gotz M. 2005. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. Curr Top Dev Biol 69:67–99.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. 2001. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature 409:714–720.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci 22:3161–3173.

Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Ivic L, Kriegstein AR. 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci 7:136–144.

Onteniente B, Kimura H, Maeda T. 1983. Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. J Comp Neurol 215:427–436.

Ormerod BK, Galea LA. 2003. Reproductive status influences the survival of new cells in the dentate gyrus of adult male meadow voles. Neurosci Lett 346:25–28.

Ormerod BK, Lee TT, Galea LA. 2003. Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. J Neurobiol 55:247–260.

Ormerod BK, Lee TT, Galea LA. 2004. Estradiol enhances neurogenesis in the dentate gyri of adult male meadow voles by increasing the survival of young granule neurons. Neuroscience 128:645–654.

Pasmanik M, Callard GV. 1988. Changes in brain aromatase and 5 alpha-reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). Endocrinology 122:1349–1356.

Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, Adrio F, Gueguen MM, Tascon C, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. Gen Comp Endocrinol 142:60–66.

Peterson RS, Lee DW, Fernando G, Schlinger BA. 2004. Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. J Comp Neurol 475(2):261–269.

Rakic P. 1978. Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. Postgrad Med J 54(Suppl 1):25–40.

Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J Neurosci 21:7153–7160.

Shu SY, Ju G, Fan LZ. 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. Neurosci Lett 85: 169–171.

Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 2005. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. J Neurosci 25:10–18.

Strobl-Mazzulla PH, Moncaut NP, Lopez GC, Miranda LA, Canario AV, Somoza GM. 2005. Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. Gen Comp Endocrinol 143:21–32.

Tanapat P, Hastings NB, Reeves AJ, Gould E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. J Neurosci 19:5792–5801.

Tchoudakova A, Callard GV. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. Endocrinology 139:2179–2189.

Tchoudakova A, Kishida M, Wood E, Callard GV. 2001. Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. J Steroid Biochem Mol Biol 78:427–439.

Villar-Cheda B, Perez-Costas E, Melendez-Ferro M, Abalo XM, Rodriguez-Munoz R, Anadon R, Rodicio MC. 2006. Cell proliferation in the forebrain and midbrain of the sea lamprey. J Comp Neurol 494:986–1006.

Wise PM, Dubal DB, Rau SW, Brown CM, Suzuki S. 2005. Are estrogens protective or risk factors in brain injury and neurodegeneration? Reevaluation after the Women's Health Initiative. Endocr Rev 26:308–312.

Wong KK, Chang YM, Tsang YT, Perlaky L, Su J, Adesina A, Armstrong DL, Bhattacharjee M, Dauser R, Blaney SM, Chintagumpala M, Lau

CC. 2005. Expression analysis of juvenile pilocytic astrocytomas by oligonucleotide microarray reveals two potential subgroups. Cancer Res 65:76–84.

Wullimann MF, Puelles L. 1999. Postembryonic neural proliferation in the zebrafish forebrain and its relationship to prosomeric domains. Anat Embryol (Berl) 199:329–348.

Wullimann MF, Rupp B, Reichert H. 1996. Neuroanatomy of the zebrafish brain. A topological atlas. Basel, Birkhäuser Verlag. p 1–144.

Yurco P, Cameron DA. 2005. Responses of Muller glia to retinal injury in adult zebrafish. Vision Res 45:991–1002.

Zikopoulos B, Kentouri M, Dermon CR. 2000. Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*). Brain Behav Evol 56:310–322.

Zupanc GK. 2001. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. Brain Behav Evol 58:250–275.

Zupanc GK. 2006. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 192:649–670.

Zupanc GK, Clint SC. 2003. Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. Glia 43:77–86.

Zupanc GK, Horschke I. 1995. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. J Comp Neurol 353: 213–233.

Zupanc GK, Zupanc MM. 1992. Birth and migration of neurons in the central posterior/prepacemaker nucleus during adulthood in weakly electric knifefish (*Eigenmannia* sp.). Proc Natl Acad Sci U S A 89:9539–9543.

Zupanc GK, Hinsch K, Gage FH. 2005. Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. J Comp Neurol 488:290–319.

Zwain IH, Yen SS. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. Endocrinology 140: 3843–3852.

Zwain IH, Yen SS, Cheng CY. 1997. Astrocytes cultured in vitro produce estradiol-17beta and express aromatase cytochrome P-450 (P-450 AROM) mRNA. Biochim Biophys Acta 1334:338–348.

Résultats – Chapitre 1, Partie 2

A *cyp19a1b*-GFP (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells

Sok-Keng Tong, Karen Mouriec, Ming-Wei Kuo, Elisabeth Pellegrini, Marie-Madeleine Gueguen, François Brion, Olivier Kah, Bon-chu Chung.

GENESIS, in press.

Dans le cerveau des poissons téléostéens, l'aromatase présente plusieurs particularités uniques et intrigantes: elle est, d'une part, fortement exprimée uniquement dans les cellules gliales radiaires et, d'autre part, fortement régulée par l'œstradiol (E2). Cette régulation œstrogénique nécessite la présence de récepteurs aux œstrogènes (ERs) qui peuvent se lier au niveau d'une séquence ERE présente sur le promoteur du gène *cyp19a1b* codant l'aromatase B, et requiert un contexte cellulaire neuroglial.

Cette publication, réalisée dans le cadre d'un programme ORCHID avec le laboratoire du Professeur Bon-chu Chung (Institut de Biologie Moléculaire, Academia Sinica, Taipei, Taiwan) rapporte la caractérisation et la validation d'un modèle de poisson zèbre transgénique aromatase B/GFP. La lignée de poisson zèbre transgénique a été obtenue par microinjection, au stade 1-2 cellules, d'une construction de 4kb mettant l'expression de la protéine exogène GFP sous le contrôle d'une partie du promoteur du gène *cyp19a1b* contenant l'ERE et l'exon I. Des expériences immunohistochimiques nous ont permis de montrer que la GFP est co-exprimée avec l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires et jamais dans les neurones. D'autre part, en traitant des poissons zèbres transgéniques avec de l'E2 seul ou en combinaison avec de l'$ICI_{182,780}$, un antagoniste des ERs, nous avons également montré que le transgène est régulé positivement par l'E2 et que cette régulation implique les ERs.

Ces données valident le modèle de poisson zèbre transgénique aromatase B/GFP, puisque les différents résultats obtenus reproduisent les processus observés chez des animaux sauvages *in vivo*. Ce modèle de poisson transgénique, à présent établi au laboratoire, constituera un bon outil pour l'étude des processus de neurogénèse et des effets des perturbateurs endocriniens *in vivo*.

J_ID: Z8T Customer A_ID: 2008-0119.R1 Cadmus Art: DVG20459 Date: 23-OCTOBER-08 Stage: I Page: 1

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

genesis 00:000–000 (2008)

TECHNOLOGY REPORT

A *cyp19a1b-GFP* (Aromatase B) Transgenic Zebrafish Line That Expresses GFP in Radial Glial Cells

Sok-Keng Tong,[1,2] Karen Mouriec,[3] Ming-Wei Kuo,[1] Elisabeth Pellegrini,[3] Marie-Madeleine Gueguen,[3] François Brion,[4] Olivier Kah,[3]* and Bon-chu Chung[1]*

[1]Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan
[2]Institute of Biochemistry and Molecular Biology, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan
[3]Neurogenesis and Œstradiol, Université de Rennes 1, UMR CNRS 6026, Rennes, France
[4]INERIS, Direction des Risques Chroniques, Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, Verneuil-en-Halatte, France

Received 28 August 2008; Revised 26 September 2008; Accepted 28 September 2008

Summary: Aromatase is an enzyme that catalyzes the synthesis of estrogen in gonads and brain. Teleost fish express aromatase (AroB) strongly in the brain facilitating its detailed examination. To understand the function of AroB in the brain, we generated transgenic zebrafish that expresses GFP driven by the brain aromatase *cyp19a1b* promoter. GFP was found in the radial glial cells of transgenic larvae and adult fish that overlap with AroB immunoreactivity in the correct temporal and spatial pattern. GFP was also coexpressed with radial cell marker BLBP, but was not in neurons. In addition, GFP expression in the radial glial cells was stimulated by estrogen, same as endogenous AroB expression. Thus, this transgenic line faithfully mimics the regulation of AroB expression in radial glial cells. It provides a powerful tool to further characterize progenitor radial cells in adult and developing fish and to evaluate estrogenic activities of xenoestrogens and phytoestrogens. genesis 00:000–000, 2008. **© 2008 Wiley-Liss, Inc.**

Key words: aromatase; estrogen synthase; estradiol; estrogen receptors; radial glia; brain lipid binding protein; transgenic; development; zebrafish; GFP; brain; central nervous system

Aromatase is an enzyme that catalyzes the synthesis of estrogens, which are important in reproduction, gonad development, bone mineralization, glucose metabolism, behavior, and so on (Simpson and Davis, 2001). Aromatase is expressed mainly in gonads and to a lower extent also in the brain, placenta, adipose tissue, skin, and endometrium. In mammals, it is the product of a single *cyp19a1* gene controlled by multiple tissue-specific promoters (Simpson, 2004). In zebrafish, there are two *cyp19a1* genes (Chiang *et al*., 2001a,b); *cyp19a1a* is expressed mainly in the gonad, whereas *cyp19a1b* (also named CYP19a2, cyp19b, P450aromB, brain aromatase or AroB in brief) is expressed only in the brain (Tong and Chung, 2003; Tong *et al*., 2001).

In contrast to the brains of mammals and birds, which express low levels of aromatase mostly in neurons (Balthazart and Ball, 1998), teleost fish possess high aromatase activities in radial glial cells of the forebrain (Forlano *et al*., 2001; Menuet *et al*., 2003, 2005; Pellegrini *et al*., 2005, 2007). This aromatase expression is stimulated by estrogens and aromatizable androgens (Callard *et al*., 2001; Le Page *et al*., 2006, 2008; Menuet *et al*., 2005), partly explaining why mature fish have very high aromatase activity.

The function of AroB in radial glial cells of the brain is largely unknown mainly because of the lack of appropriate tools to study them. To circumvent this problem, we generated transgenic fish lines that emit fluorescence in their radial glial cells for easy detection. This was accomplished by injecting into zebrafish embryos a GFP gene driven by zebrafish *cyp19a1b* promoter in a 5.1-kb DNA fragment consisting of 3.4 kb of the *cyp19a1b* gene promoter, 54-bp untranslated exon 1, 1.7-kb intron 1, and the natural ATG in exon 2 (see Fig. 1). Two transgenic fish lines that express GFP with the same expression pattern were generated. The overall GFP expression pattern was similar in all 14 male and female fish studied.

GFP expression was restricted to cells bordering the brain ventricles from the olfactory ventricle to medulla oblongata (Fig. 2A,E). Most of these cells have a GFP-positive small nucleus located in the ependymal layer and a long cytoplasmic process projecting toward the pia mater (Fig. 2A). However, in some regions, the cell nuclei are located slightly away from the ventricles and exhibit two processes, a short one toward the ventricle

*Correspondence to: Bon-chu Chung, Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taipei, Taiwan. E-mail: mbchung@gate.sinica.edu.tw or Olivier Kah, Neurogenesis and Œstradiol, Université de Rennes 1, UMR CNRS 6026, IFR 140, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France. E-mail: olivier.kah@univ-rennes1.fr

Contract grant sponsors: National Science Council of Taiwan, CNRS, ANR, European Union, the Taiwan-France ORCHID Exchange Program
Published online 00 Month 2008 in
Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
DOI: 10.1002/dvg.20459

Author Proof

ID: ananda Date: 23/10/08 Time: 12:05 Path: J:/Production/DVG#/Vol00000/080103/3B2/C2DVG#080103

J_ID: Z8T Customer A_ID: 2008-0119.R1 Cadmus Art: DVG20459 Date: 23-OCTOBER-08 Stage: I Page: 2

and a longer one toward the outer surface of the brain (Fig. 2I). Such cells were observed in the ventral zone of the periventricular hypothalamus, the periventricular nucleus of the posterior tuberculum, and around the posterior recess of the hypothalamus.

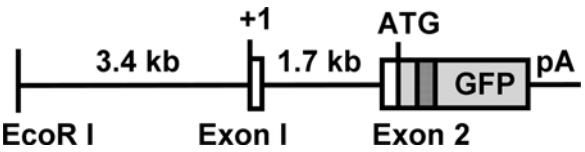


FIG. 1. Diagram showing the *cyp19a1b*-GFP construct that was injected to produce F0 founders. The construct contains 3,424 bp of the 5′ flanking region, 54 bp of exon I (untranslated), 1,698 bp of intron I (black line), and 20 bp of untranslated exon II (white box) followed by the natural translation start site. The GFP gene with the SV40 polyA sequence (pA) was fused to the first 10 amino acids of CYP19A1B (gray box) with a 9-aa linker (stripped box).

To assess whether GFP is indeed expressed in AroB-expressing cells, transverse sections of transgenic fish were labeled with AroB antibodies, then examined under low (Fig. 2E–H), median (Figs. 2A–D and 3A–C), and high magnifications (Figs. 2I–L and 3D–F). All GFP-positive cells were also labeled with the AroB antibody at the level of the cell bodies and the long radial extensions, except GFP was also observed within the radial cell nuclei as expected. Within the radial processes, the subcellular distribution varied slightly. Although GFP was strongly expressed in cell bodies including the nucleus and the end-feet of the radial cells, AroB was more obvious in the radial processes (Figs. 2I–L and 3D–F). As a result, when pictures were merged, some portions of the processes appeared yellow, whereas others were green or red (Figs. 2L and 3F). The nucleus of the radial glial cells remains green, whereas the cytoplasm shows yellow color (Figs. 2L and 3F).

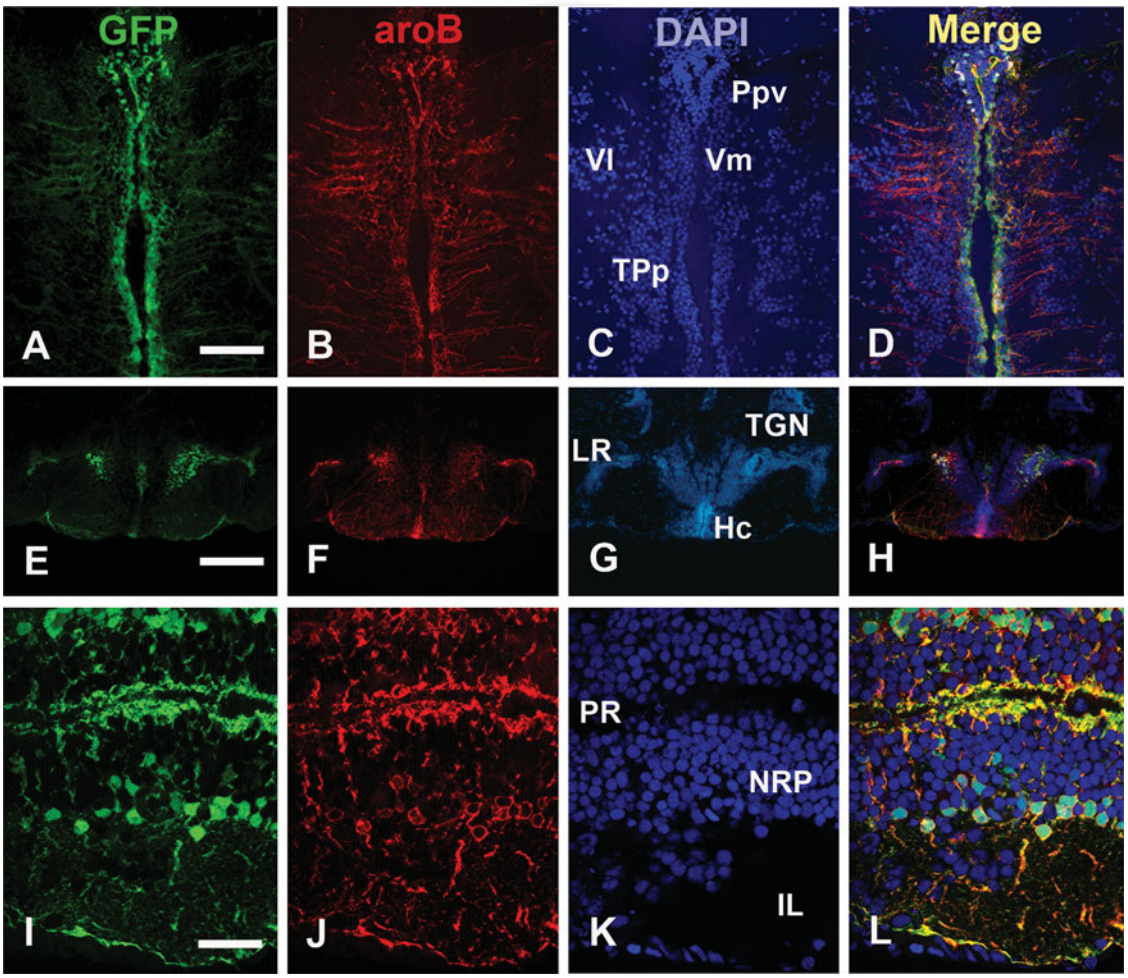


FIG. 2. Expression of GFP in AroB immunoreactive cells in diencephalon of adult zebrafish brain. (**A–D**) Thalamic region, (**E–H**) the caudal hypothalamus, (**I–L**) the posterior recess of the hypothalamus. Cross sections of the adult brain are shown with the dorsal to the top. Green: GFP fluorescence, Red: AroB immunostaining. Hc, caudal hypothalamus; LR, lateral recess; NRP, nucleus of the posterior recess; PR, posterior recess; Ppv, periventricular pretectal nucleus; TGN, tertiary gustatory nucleus; TPp, periventricular nucleus of posterior tuberculum; Vl, ventrolateral thalamic nucleus; Vm, ventromedial thalamic nucleus. Scale bars are 75 μm in (A), 200 μm in (E), and 20 μm in (**I**).

ID: ananda Date: 23/10/08 Time: 12:05 Path: J:/Production/DVG#/Vol00000/080103/3B2/C2DVG#080103

J_ID: Z8T Customer A_ID: 2008-0119.R1 Cadmus Art: DVG20459 Date: 23-OCTOBER-08 Stage: I Page: 3

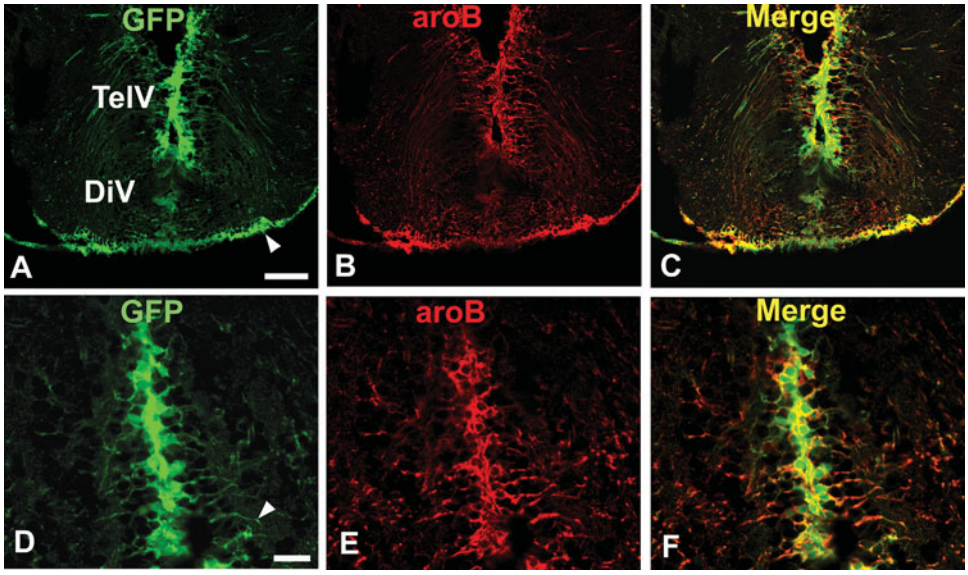


FIG. 3. Expression of GFP in AroB immunoreactive cells in forebrain of adult zebrafish. (**A–C**) Telecephalon, (**D–F**) higher magnification of the radial glial cell in midline region of telecephalon. Cross sections of the adult brain are shown with the dorsal to the top. Green: GFP fluorescence, Red: AroB immuno-staining. TelV, telencephalic ventricle; DiV, ventral diencephalons. Arrowhead in (A) indicates the end-feet while that in (D) indicates the processes. Scale bar in (A) is 500 μm while the one in (D) indicates 200 μm.

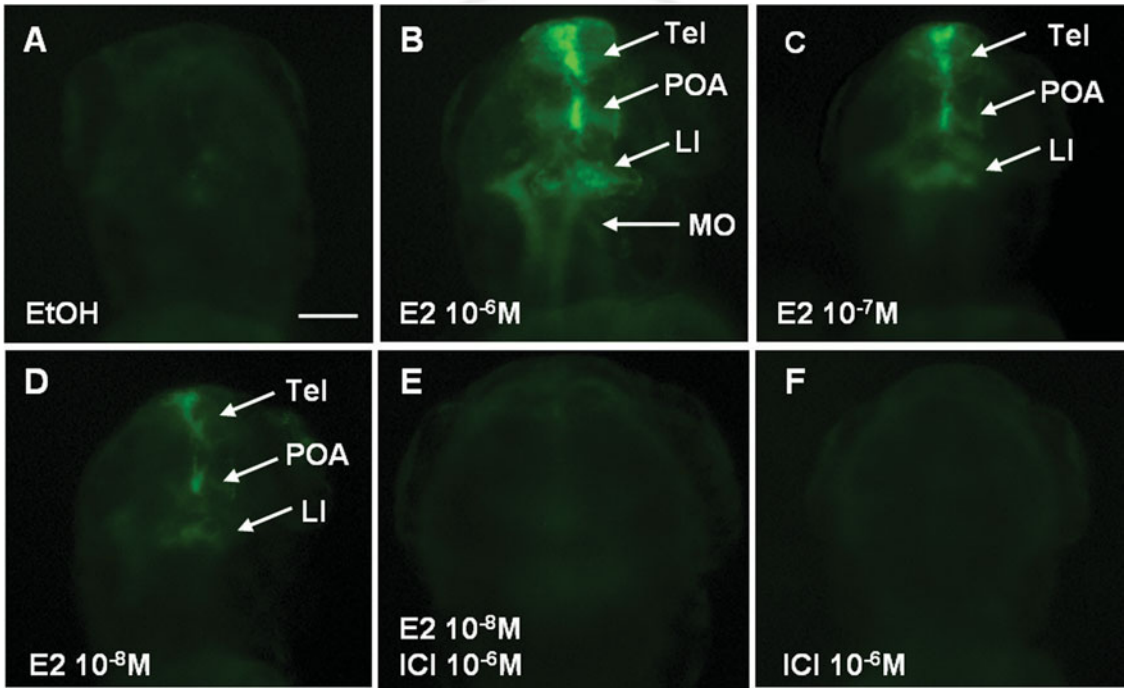


FIG. 4. Effects of estradiol treatments on GFP expression in transgenic zebrafish. (**A**) EtOH vehicle control, (**B**) Estradiol (E2 10^{-6} M), (**C**) E2 10^{-7} M, (**D**) E2 10^{-8} M, (**E**) E2 10^{-6} M and ICI 10^{-6} M, (**F**) ICI 10^{-6} M alone. Dorsal views of the larvae were shown with anterior to the top. E2 causes a dose-dependent increase of GFP in the telencephalon (Tel), the preoptic area (POA), and the inferior lobe of the hypothalamus (LI) at 4dpf. In (B), estradiol at 10^{-6} M also causes expression of GFP in the medulla oblongata (MO). Scale bar is 200 μm.

We also examined the effects of 17β-estradiol (E2) on GFP expression during fish development. GFP was first detected in transgenic progeny at 9 days post fertilization (dpf) in the absence of any treatment, similar to what was found for AroB expression in wild-type zebrafish larvae (Menuet *et al.*, 2005). Before then, no GFP expression was detected (Fig. 4A). When 0.5-dpf embryos were treated with E2 at the highest dose of 10^{-6} M for 3 days, GFP signal was strong in the telencephalon, the preoptic area, the inferior lobe of the hypothalamus, and the medulla oblongata of 3.5-dpf larvae (Fig. 4B) as well as in the caudal olfactory bulb and the optic tecta. At lower doses, expression was still noticeable within the anterior brain, but was reduced in

ID: ananda Date: 23/10/08 Time: 12:05 Path: J:/Production/DVG#/Vol00000/080103/3B2/C2DVG#080103

J_ID: Z8T Customer A_ID: 2008-0119.R1 Cadmus Art: DVG20459 Date: 23-OCTOBER-08 Stage: I Page: 4

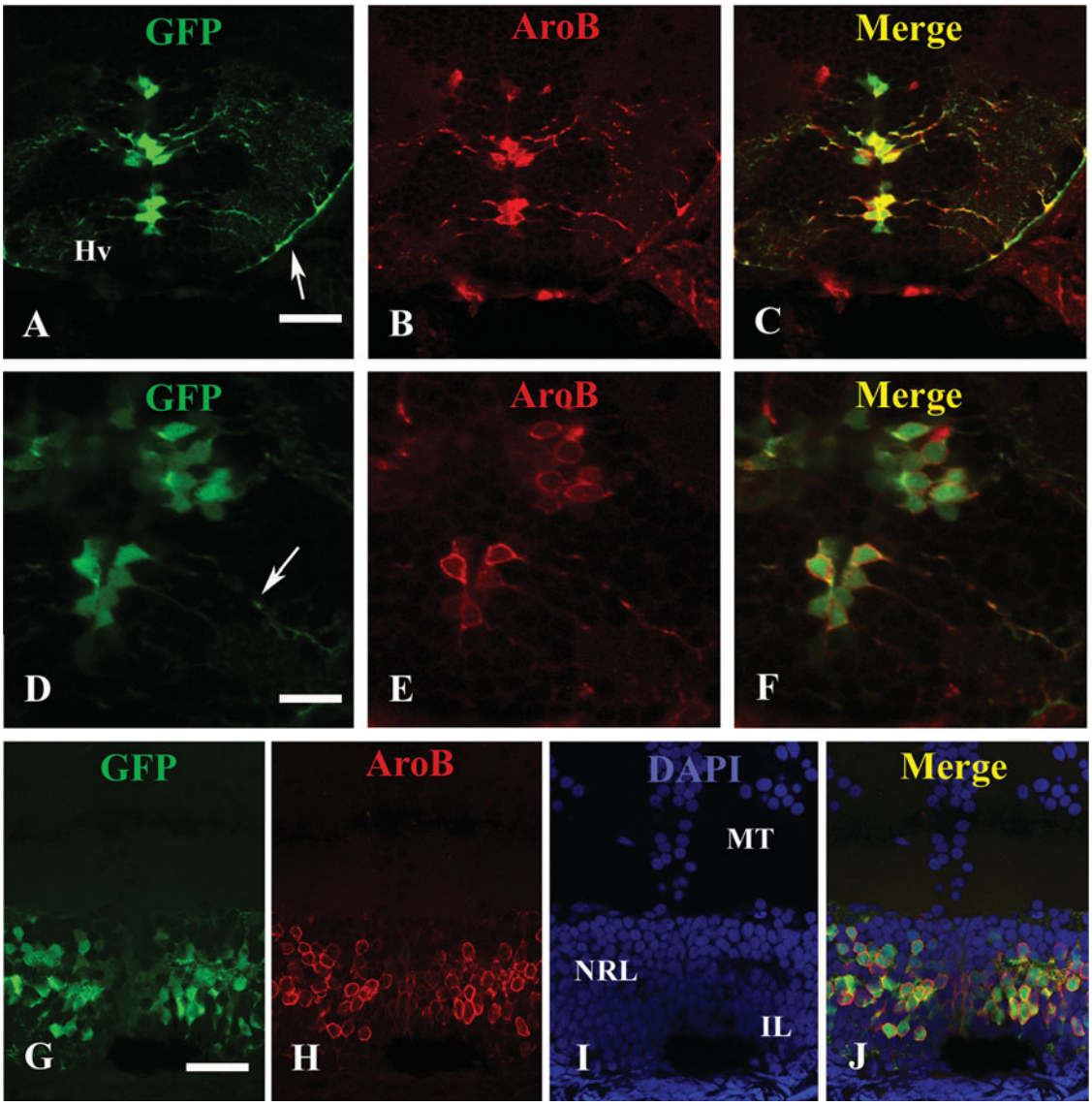


FIG. 5. Cross sections of hypothalamus in the E2-treated zebrafish larval brain showing GFP expression in AroB immunoreactive cells. GFP is expressed in the entire cell including the nucleus, whereas AroB is only present in the cytoplasm and the long radial processes in the preoptic area (**A–C**), anterior hypothalamus (**D–F**), and the region near lateral recess (**G–I**) of 8 dpf zebrafish larvae that had been treated with 10^{-6} M E2 for 2 days. Arrows in A and D indicate GFP accumulation in end-feet and in the processes of radial glial cells, respectively. Hv, ventral hypothalamus; IL, inferior lobe of hypothalamus; MT, midbrain tegmentum; NRP, nucleus of the posterior recess. Scale bars are 25 μm in (A), 12 μm in (D), and 20 μm in (G).

the mesencephalon and rhombencephalon (Fig. 4C,D). In E2-treated larvae, no GFP expression was observed outside the brain whatever the age of the animals. In particular, no GFP expression was detected in the eye. As expected, cotreatment with estrogen receptor antagonist ICI 182780 causes disappearance of GFP expression (Fig. 4E,F).

To identify the types of cells that express GFP in more detail, higher magnification of the transverse sections of the hypothalamus was examined (see Fig. 5). GFP expression and AroB immunoreactivity were both present in radial glial cells in areas like the preoptic area (Fig. 5A–C), the anterior hypothalamus (Fig. 5D–F), and inferior lobe around the lateral recess (Fig. 5G–J) of 8-dpf larvae, which had been treated with E2 (10^{-6} M) for 2 days. Similar expression patterns were also observed in the 2-, 3-, and 5-dpf larvae that had been treated with E2 for 2 days (data not shown). Same as in adults, GFP was more expressed in cell bodies including the nuclei and in the end-feet located at the surface of the brain (Fig. 5A–C).

To further characterize the nature of GFP expressing glial cells, we compared GFP expression with that of a glial cell marker, brain lipid binding protein (BLBP)

ID: ananda Date: 23/10/08 Time: 12:06 Path: J:/Production/DVG#/Vol00000/080103/3B2/C2DVG#080103

J_ID: Z8T Customer A_ID: 2008-0119.R1 Cadmus Art: DVG20459 Date: 23-OCTOBER-08 Stage: I Page: 5

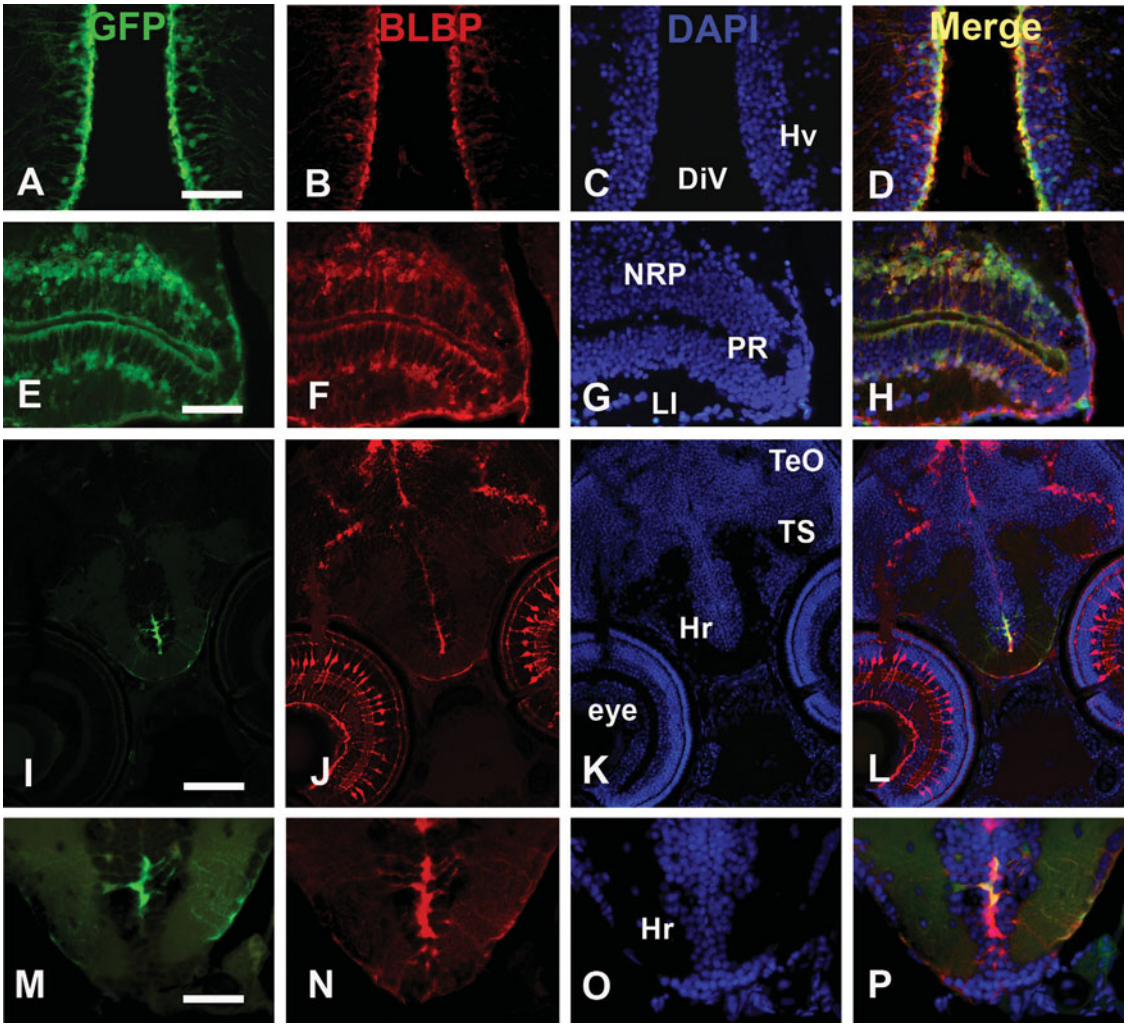


FIG. 6. Expression of GFP in comparison with brain lipid binding protein (BLBP) expression in the brain. All GFP-positive radial cells also express BLBP in ventral hypothalamus (**A–D**) and posterior recess area (**E–H**) of the hypothalamus. Müller glia is strongly stained by BLBP but does not exhibit GFP staining (**J**, **L**). (A–H) Adult hypothalamus; (**I–P**) 3-dpf larval brain treated with E2; (**M–P**) higher magnification of rostral hypothalamus in I–L. DiV, diencephalic ventricle; Hr, rostral hypothalamus; Hv, ventral hypothalamus; NRP, nucleus of the posterior recess; PR, posterior recess; TeO, optic tectum; TS, torus semicircularis; LI, inferior lobe of the hypothalamus. Scale bars are 25 μm in (A), 25 μm in (E), 40 μm in (I), and 20 μm in (M).

(Hartfuss *et al*., 2001), which labels radial glia in adult fish brain or Müller glia in the retina. GFP-expressing cells in ventral hypothalamus (Fig. 6A–D) and posterior recess (Fig. 6E–H) of the adult brain as well as in rostral hypothalamus of larval fish (Fig. 6M–P) also expressed BLBP. BLBP was additionally expressed in the radial glia of optic tectum, torus semicircularis, and Müller glia of the larval fish that lacked GFP signal (Fig. 6I–L).

Although a large majority of GFP-positive cells also expressed the radial cell marker BLBP, none was labeled by markers of postmitotic neurons such as Hu or acetylated tubulin (data not shown), similar to what has been observed before for AroB-positive cells in adult fish (Pellegrini *et al*., 2007).

Radial cells serve as a scaffold for neuronal migration during development (Bentivoglio and Mazzarello, 1999). In addition, they are also neuronal progenitors for most neurons in the brain (Adolf *et al*., 2006; Malatesta *et al*., 2000; Noctor *et al*., 2002; Pellegrini *et al*., 2007). In contrast to mammals, adult fish brains possess high neurogenic activity and regenerative capacity, likely because of the persistence of radial cells throughout life (Zupanc, 2001, 2006; Zupanc and Zupanc, 2006).

The reason why AroB expression is so strong in the brain of adult fish is still not understood. One possibility is that the production of estradiol would allow fish brain to establish a permissive environment for the maintenance of active progenitors throughout adulthood. Aromatase is present in radial glial cells of the mouse developing cortex, and in vitro E2 administration rapidly promotes proliferation (Martinez-Cerdeno *et al*., 2006). Furthermore, in utero blockade of estrogen receptors

ID: ananda Date: 23/10/08 Time: 12:06 Path: J:/Production/DVG#/Vol00000/080103/3B2/C2DVG#080103

decreases proliferation of embryonic cortical progenitor cells (Martinez-Cerdeno *et al*., 2006). We thus suggest that the expression of AroB in progenitor cells could be an exaggeration in fish of a more general mechanism implicating estradiol in neurogenesis (Mouriec *et al*., 2008).

In conclusion, we have generated transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish line that shows faithful regulation and expression of *cyp19a1b* in radial glial cells of the brain. This fish line will be very helpful for future studies of radial glial cell functions in the developing or adult brain. In addition, given the very high E2-sensitivity of the *cyp19a1b* gene, this fish line will be very useful for rapid screening of estrogenic activities in vivo.

METHODS

Zebrafish

Zebrafish was raised at 28.5°C in recirculated water under a 14 h light:10 h dark cycle. Animals were treated according to the IACUC regulation regarding animal handling. Stages were determined according to time postfertilization and characteristics described in the zebrafish book (http://zebra.sc.edu/guides.html).

Generation of Transgenic Fish

Four cyp19a1b genomic clones as bacterial artificial chromosome (BAC) were isolated by hybridization with a cyp19a1b cDNA fragments (1–435 nt) from a library containing zebrafish genomic DNA consisting of 73,728 clones in a nylon membrane (BAC Zebrafish filter set kit, Incyte Genomic) with an average of 120 kb. A 12-kb EcoRI fragment containing the cyp19a1b promoter was first subcloned into the pbluescriptSK$^+$ vector; then a 5.1-kb fragment containing the 5′ region, the first intron, and the first 10 codons of the cyp19a1b coding region was fused to a GFP cDNA and SV40 polyA sequence to form cyp19a1b-GFP. This plasmid was linearized and injected into about 1,500 embryos at the 1–2 cell stage. About 120 larvae expressed GFP in the brain since 4 dpf. About 70 fluorescent fish were raised to adulthood and allowed to produce progenies. Two female fish transmit their GFP gene through the germ line with the same GFP expression patterns. All data shown in this study were analyzed using F3 (or beyond) progenies of one of the two lines.

Immunohistochemical Procedures

E2 and its antagonist ICI182780I were dissolved in ethanol as 10^{-3} M stocks and these solutions were added to the embryo medium adjusting to the desired final concentration. Corresponding amount of ethanol solvent was added to the control medium as mock control. Fresh steroids were replaced daily. In Figure 4, heterozygous embryos were immersed in E2 from 0.5 to 3.5 dpf, fish larvae were then examined for GPF fluorescence. In all other cases, heterozygous larvae were treated with E2 (10^{-6} M) for 2 days before immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (0.1 M). After rinsing, they were immersed in 15% sucrose, embedded in Tissuetek, and cut transversely at 12 μm.

Adult transgenic animals (seven males and seven females) were anesthetized on ice and their brains fixed by overnight immersion in the same fixative. After rinsing, samples were dehydrated and embedded in paraffin to obtain transverse sections (7 μm). Incubation with the specific zebrafish AroB antibodies (Menuet *et al*., 2005) was performed overnight (1:1,000–1:3,000 with 0.5% milk powder in PBST).

The specificity of the staining was controlled by processing adjacent sections without primary antibody, with the preimmune serum, and with the antibody preabsorbed with the synthetic peptide (antibody to CNSNGETADNRTSKE; 1 mg/ml).

The localization and nomenclature of brain nuclei in adults and larvae were according to Wullimann *et al*. (1996) and Mueller and Wullimann (2005), respectively (Mueller and Wullimann, 2005; Wullimann *et al*., 1996).

Micrographs were taken with either an Olympus Provis upright microscope equipped with the Cell software (Figs. 4G–J and 5A–H), a Leica TCS NT confocal microscope equipped with LCS Lite software (Fig. 4A–F), a Zeiss Apotome Upright microscope with the Axiovision software (Figs. 2A–L and 5I–P), or a Leica MZFLIII fluorescence stereomicroscope with Spot CCD microscope digital cameras and software (Fig. 3A–F).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Roselyne Primault (Département de Microscopie, Université de Rennes 1) for help with the Leica TCS NT confocal microscopy and IFR 140 zebrafish facilities for technical assistance.

LITERATURE CITED

Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tannhauser B, Strahle U, Gotz M, Bally-Cuif L. 2006. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. Dev Biol 295:278–293.

Balthazart J, Ball GF. 1998. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). Trends Neurosci 21:243–249.

Bentivoglio M, Mazzarello P. 1999. The history of radial glia. Brain Res Bull 49:305–315.

Callard GV, Tchoudakova AV, Kishida M, Wood E. 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. J Steroid Biochem Mol Biol 79:305–314.

Chiang EF, Yan YL, Guiguen Y, Postlethwait J, Chung B. 2001a. Two *Cyp19* (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. Mol Biol Evol 18:542–550.

Chiang EF, Yan YL, Tong SK, Hsiao PH, Guiguen Y, Postlethwait J, Chung BC. 2001b. Characterization of duplicated zebrafish *cyp19* genes. J Exp Zool 290:709–714.

Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass AH. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: Aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. J Neurosci 21:8943–8955.

Hartfuss E, Galli R, Heins N, Gotz M. 2001. Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. Dev Biol 229:15–30.

Le Page Y, Menuet A, Kah O, Pakdel F. 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. Mol Reprod Dev 75:1549–1557.

Le Page Y, Scholze M, Kah O, Pakdel F. 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. Environ Health Perspect 114:752–758.

Malatesta P, Hartfuss E, Gotz M. 2000. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. Development 127:5253–5263.

Martinez-Cerdeno V, Noctor SC, Kriegstein AR. 2006. Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. Eur J Neurosci 24: 3475–3488.

Menuet A, Anglade I, Le Guevel R, Pellegrini E, Pakdel F, Kah O. 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor α. J Comp Neurol 462:180–193.

Menuet A, Pellegrini E, Brion F, Gueguen MM, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. J Comp Neurol 485:304–320.

Mouriec K, Pellegrini E, Anglade I, Menuet A, Adrio F, Thieulant ML, Pakdel F, Kah O. 2008. Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: Evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis? Brain Res Bull 75:274–280.

Mueller T, Wullimann MF. 2005. Atlas of early zebrafish brain development: A tool for molecular neurogenetics, 1st ed. Amsterdam: Elsevier. xi,183 p.

Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein AR. 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci 22:3161–3173.

Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, Adrio F, Gueguen MM, Tascon C, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. Gen Comp Endocrinol 142:60–66.

Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdel F, Kah O. 2007. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. J Comp Neurol 501:150–167.

Simpson ER. 2004. Aromatase: Biologic relevance of tissue-specific expression. Semin Reprod Med 22:11–23.

Simpson ER, Davis SR. 2001. Minireview: Aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis—Some new perspectives. Endocrinology 142:4589–4594.

Tong SK, Chiang EF, Hsiao PH, Chung B. 2001. Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish *cyp19* (P450 aromatase) genes. J Steroid Biochem Mol Biol 79:299–303.

Tong SK, Chung BC. 2003. Analysis of zebrafish *cyp19* promoters. J Steroid Biochem Mol Biol 86:381–386.

Wullimann MF, Rupp B, Reichert H. 1996. Neuroanatomy of the zebrafish brain: A topological atlas. Basel: Birkhèauser Verlag. vi, 144p.

Zupanc GK. 2001. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. Brain Behav Evol 58:250–275.

Zupanc GK. 2006. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 192:649–670.

Zupanc GK, Zupanc MM. 2006. New neurons for the injured brain: Mechanisms of neuronal regeneration in adult teleost fish. Regen Med 1:207–216.

Author Proof

Résultats – Chapitre 2

Expression et régulation de l'aromatase B par les stéroïdes

Partie 1 ……67

Spatiotemporal relationship between *cyp19a1b* (aromatase B) and estrogen-receptor expression in the brain of developing zebrafish

Karen Mouriec, Christèle Lethimonier, Jean-Jacques Lareyre, Elisabeth Pellegrini, Farzad Pakdel, Olivier Kah, Isabelle Anglade.

Partie 2 ……85

Androgens upregulate *cyp19a1b* (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors

Karen Mouriec, Marie-Madeleine Gueguen, Christelle Manuel, Frédéric Percevault, Marie-Lise Thieulant, Farzad Pakdel, Olivier Kah.

BIOLOGY OF REPRODUCTION, accepted for publication

Résultats – Chapitre 2, Partie 1

Spatiotemporal relationships between *cyp19a1b* (aromatase B) and estrogen-receptor expression in the brain of developing zebrafish

Karen Mouriec, Christèle Lethimonier, Jean-Jacques Lareyre, Elisabeth Pellegrini, Farzad Pakdel, Olivier Kah, Isabelle Anglade.

Chez les Vertébrés, l'œstradiol (E2) exerce de multiples rôles dans l'organisation et le développement du système nerveux central. Notamment, chez les Mammifères, l'aromatase cérébrale conduit à l'aromatisation de la testostérone pendant une période critique de développement et induit un dimorphisme sexuel de certaines structures cérébrales. Après cette période, l'expression de l'aromatase cérébrale décline et demeure faible chez l'adulte. Dans le cerveau, l'expression de l'aromatase serait plutôt contrôlée par les androgènes. Au contraire, chez les poissons, les travaux de l'équipe ont montré que l'expression de l'aromatase était très fortement régulée par l'E2 *in vivo* et *in vitro*. Afin de déterminer à quel stade du développement du poisson zèbre, cette régulation œstrogénique se met en place, nous avons, à l'aide d'expériences de RT-PCR en temps réel et d'hybridation *in toto*, caractérisé les cinétiques d'expression de chacune des 3 formes de récepteurs des œstrogènes (zfERs) ainsi que celle de l'aromatase B.

Nous montrons ainsi que l'aromatase B et les zfERs sont exprimés très tôt pendant le développement et qu'une forte augmentation des ARN messagers de chaque zfER et de l'aromatase B se produit entre 24 et 48 heures. Afin de confirmer que ce phénomène correspond en fait à la mise en place d'une régulation œstrogénique, nous avons traité des embryons de poisson zèbre avec un antagoniste des ERs ($ICI_{182,780}$) et suivi l'expression de l'aromatase B pendant le développement. Cette cinétique nous a permis de montrer que l'expression précoce de l'aromatase B était dépendante de la présence d'ERs. Il semblerait que cette régulation dépendrait plus de la présence de zfERβ, détectables dans le cerveau des embryons dès 36 heures post fertilisation (hpf). Par ailleurs, nous montrons que l'aromatase B est stimulable par l'E2 dès 36 hpf et que cet effet est bloqué par l'ICI. Les messagers zfERα, détectés par RT-PCR en temps réel correspondraient plus, quant à eux, à une expression de zfERα au niveau du foie dès 48h, comme révélé par hybridation *in toto*.

Ces résultats mettent en avant l'existence d'un lien étroit entre l'expression d'aromatase B et celle des zfERs au cours du développement cérébral.

Spatio-Temporal Relationship Between *Cyp19a 1b* (Aromatase B) and Estrogen Receptor Expression in Developing Zebrafish Brain

Karen Mouriec, Christelle Lethimonier, Jean-Jacques Lareyre*, Elisabeth Pellegrini, Farzad Pakdel, Olivier Kah And Isabelle Anglade

Neurogenesis And Œstrogens, UMR CNRS 6026, IFR 140 Université de Rennes 1, Rennes, France

**Sexualité et Reproduction des Poissons, IFR 140, INRA SCRIBE, Rennes France*

Correspondence to: Isabelle Anglade or Olivier Kah, IFR 140, Université de Rennes 1,UMR CNRS 6026, Neurogenesis And Œstrogens, Campus de Beaulieu 35042 Rennes cedex, France

+33- (0)2 23 23 67 65

+33- (0)2 23 23 67 94

isabelle.anglade@univ-rennes1.fr

olivier.kah@univ-rennes1.fr

Key Words: development, Zebrafish, brain, estrogen receptor and aromatase B

Abstract

It is now well admitted that estrogens have important actions in the development and function of the central nervous system, through the modulation of cell proliferation and survival or that neural differentiation. In adult zebrafish, the expression of aromatase B (AroB, the product of the *cyp19a1b* gene), which occurs only in radial glial cells, is strongly up-regulated by estradiol. This stimulation involves the binding of estrogen receptors (ER) to a responsive element on the proximal *cyp19a1b* promoter. Whether such molecular interactions sustain AroB expression during early development remains an open question. In this study, we characterize the spatio-temporal expression of the three zebrafish ERs (zfERs) and AroB during development using whole-mount in situ hybridization and quantitative real-time RT-PCR. We evidence a different spatiotemporal expression of zfERs during the early steps of development and a significant induction of their expression occurring between 24 and 48 hpf (hours post-fertilization). We further show that zfERβ1 and zfERβ2 mRNA are early expressed in developing neuroendocrine regions, whilst zfERα mRNAs are not detected in the brain before two weeks post fertilization. In addition, we show a strong increase in AroB mRNA levels occurs between 24 and 48 hpf. This increase is largely blocked by the pure anti-estrogen $ICI_{182,780}$, indicating that expression of AroB is timely correlated with the appearance of zfERs. Altogether, our data show that functional zfERs appear in the brain of zebrafish between 24 and 48 hpf, and that zfERβs are most likely involved in the early expression of *cyp19a1b*.

Introduction

Following seminal studies by Callard and colleagues, the brain of fish has been known for its expectionally high aromatase activity (Pasmanik and Callard 1985), which function still remains unknown. Recent studies in a variety of species have evidenced several unique features of brain aromatase in fish compared to other vertebrates. It has been demonstrated that brain aromatase activity in fish results from the expression of one of the two aromatase genes that arose from the teleost specific genome duplication (Steinke et al. 2006). Extensive data have shown that the *cyp19a1a* gene (encoding aromatase A) is expressed in the gonads, while the other, *cyp19a1b* (encoding aromatase B), is expressed mostly in the brain (Blazquez and Piferrer 2004; Callard and Tchoudakova 1997; Menuet et al. 2005; Tchoudakova and Callard 1998; Tong and Chung 2003). Recent studies in several species, have indicated that aromatase B (AroB) expression surprisingly occurs in radial glial cells (Forlano et al. 2001; Menuet et al. 2003; Menuet et al. 2005; Pellegrini et al. 2007; Strobl-Mazzulla et al. 2005). In the brain of mammals and birds, although essentially reported to be expressed in neurons (Balthazart and Ball 1998), aromatase was also detected in radial glial cells in situation of brain repair, following cortical lesioning of zebrafinch (Peterson et al. 2004), and in the embryonic cortex of the mouse (Martinez-Cerdeno et al. 2006). Brain aromatase in fish has another unique characteristic which is its strong up-regulation by estrogens, as determined by different techniques (Callard et al. 2001; Kishida et al. 2001; Menuet et al. 2005; Trant et al. 2001). A treatment with $ICI_{182,780}$, an antagonist of estrogen receptors (ERs), completely blocks this induction (Menuet et al. 2005), thereby indicating the participation of these ligand-dependent transcription factors in the up-regulation of AroB by estrogens. Importantly, this stimulatory effect of estradiol (E2) on AroB expression occurs only in radial glial cells. Further in vitro studies showed that this process requires at the same time a functional estrogen response element (ERE) located within the *cyp19a1b* gene promoter, a neuro-glial

context and the presence of ERs (Le Page et al. 2008; Le Page et al. 2006; Menuet et al. 2005).

In contrast to mammals, which have two ERs, teleosts have three genes encoding such proteins (Hawkins et al. 2000; Menuet et al. 2002), *esr1* (ERα), *esr2a* (ERβ2) and *esr2b* (ERβ1) (Filby and Tyler 2005; Hawkins et al. 2000; Menuet et al. 2002). In adult zebrafish, zfER mRNAs exhibit distinct, but partially overlapping pattern of expression in the brain. They are mainly expressed in the neuroendocrine region such as preoptic area and hypothalamus (Menuet et al. 2002).

Currently, there is no information regarding the mechanisms that mediate expression of aromatase B during early development. In the present study, we sought to determine whether the mechanisms involved in the early expression of aromatase B in the brain of zebrafish were dependent upon the precocious expression of a specific zfER form. We therefore used whole-mount *in situ* hybridization and real-time PCR experiments to follow in parallel the spatio-temporal expression of the three zfER and that of AroB.

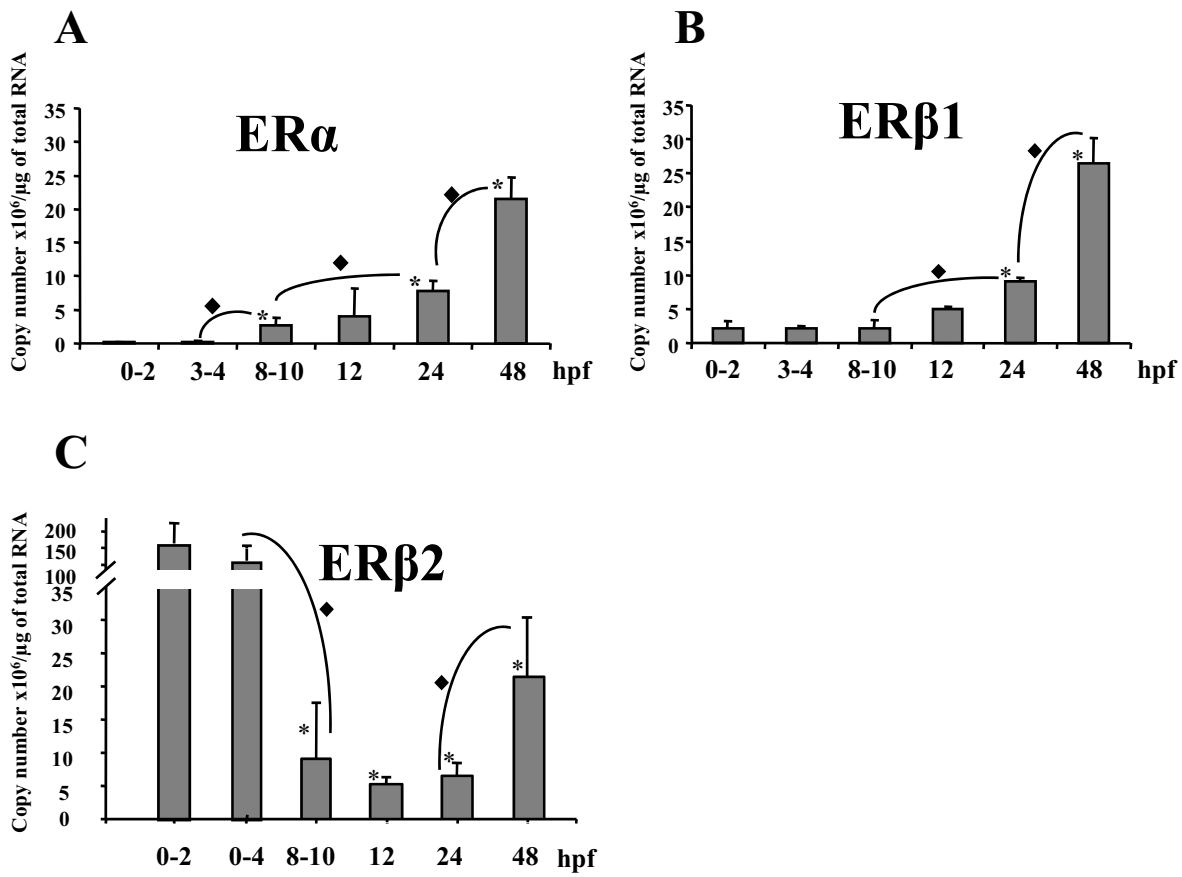


Figure 1: Expression of zfERα, zfERβ1, zfERβ2 during early development as determined by quantitative RT-PCR. For each experiment, n=100 ± 5 embryos were used for each stage. Data are the mean of three independent layings. Results are expressed as the number of copies / µg of total RNA. Data were analyzed using the non parametric Mann-Whitney U test (ranking method) of the Statistica software (Statsoft, France). Asterisks (*) indicate significant differences with stage 0 hpf ($p<0.05$). (♦) indicates a significant difference with indicated stage ($p< 0.05$).

Results

Early expression of zfERα, zfERβ1 and zfERβ2 mRNAs

In order to follow the expression of all zfER forms during the development of zebrafish, we first performed quantitative RT-PCR experiments on pools of embryos at 2, 4, 8, 12, 24 and 48 hpf. A straightforward measurement of mRNA by real-time RT-PCR during early development is generally hindered by the difficulty to find house-keeping genes whose expression remains constant over the first two days of development. In the present case, as could be expected, all house-keeping genes (beta-actin, GAPDH, RNA 18S), classically used for standardization in such experiments, showed important variations over the first two days of development (data not shown). Moreover, several reports have indicated that some of these classical reference genes, such as elongation factor 1 alpha, beta-actin or GAPDH, are affected by estrogen treatment (Filby and Tyler 2007), thereby preventing their use in this study aiming to characterize the establishment of an estrogen-sensitive system during the development. We expressed the data as absolute copy number determined from a standard curve using cloned cDNAs. Although this may in theory increase the variability between different assays, we found that the results were reproducible, as shown by the reduced standard errors. All quantitative PCR results shown are therefore expressed as the absolute number of copies per µg total RNA.

The amounts of zfERα mRNA, detected as early as 8-10 hpf, exhibit a progressive and significant increase between 24 hpf and 48 hpf (Fig. 1A). Similarly, the expression of zfERβ1 is almost undetectable during the first stages, and then progressively increases following activation of zygotic transcription (around 5 hpf). As for zfERα, there is a significant increase in zfERβ1 mRNA amounts between 24 and 48 hpf (Fig. 1B). In contrast, during the first 4 hpf, embryos contain high levels of mRNA encoding zfERβ2. These

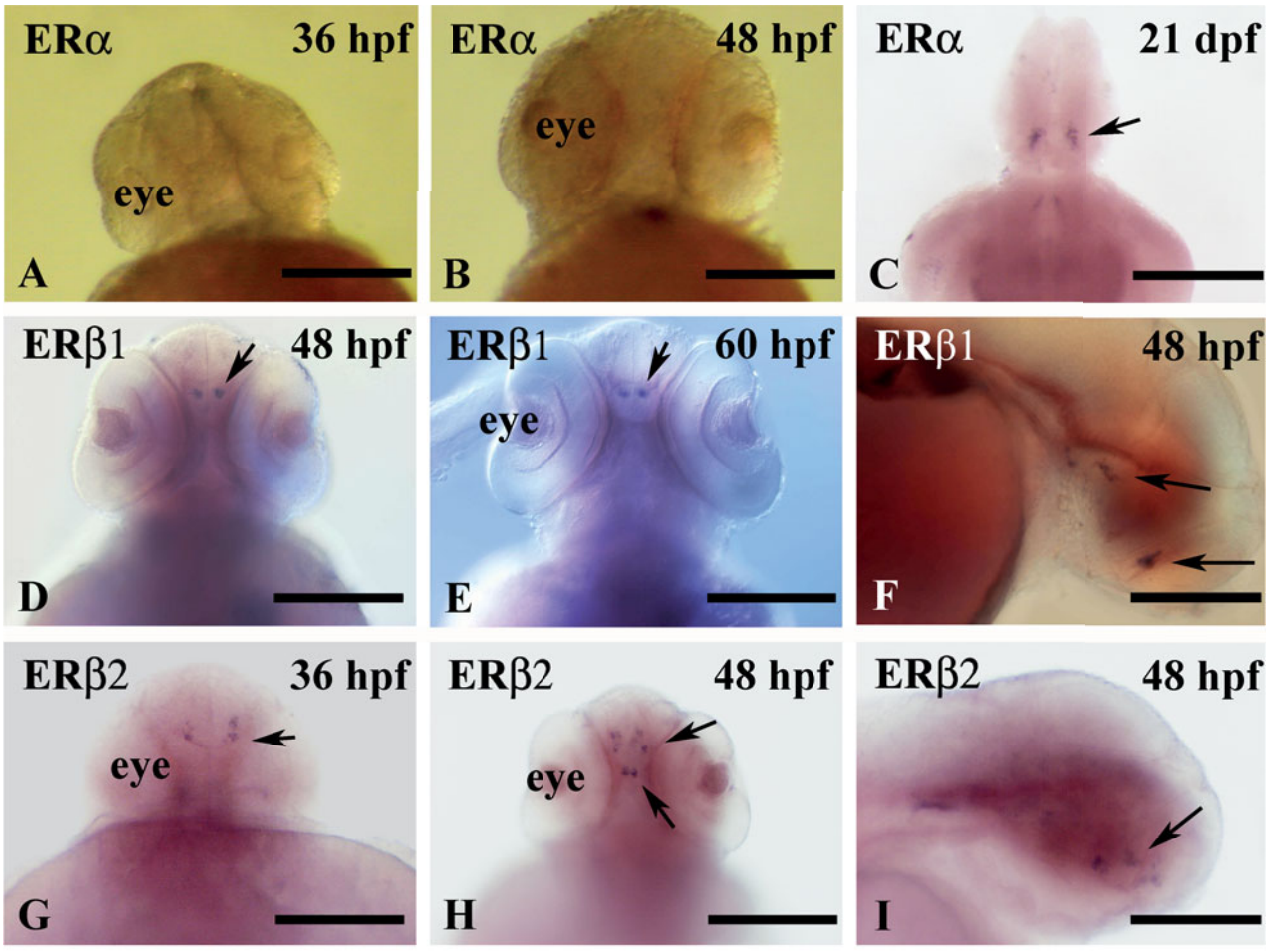


Figure 2: Distribution of zfERα, zfERβ1 and zfERβ2 mRNAs in zebrafish embryos. Shown are whole-mount *in situ* hybridization performed on embryos at 36 hours post-fertilization (hpf) (A, G), 48 hpf (B, D, F, H, I), 60hpf (E) and 21day post fertilization (adult brain, C). Panels A, B, D, E, G and H are frontal views; F and I are lateral views anterior to the left. Panels D and E show a strong expression of zfERβ1 mRNA in diencephalon at 48 and 60 hpf. Sagittal view (F) reveals weak signal in the hypothalamus and liver. At 36 and 48hpf (G, H, I), zfERβ2 mRNA is present in restricted cell population of the presumptive telencephalon, preoptic region and hypothalamus of embryos.

amounts then sharply drop, probably due to mRNA degradation, and subsequently start to increase, first slowly and then, between 24 and 48 hpf, more importantly (Fig. 1C). These results are in agreement with previous data suggesting that the zfERβ2 mRNA detected before the midblastula transition are maternally inherited (Bardet et al. 2002).

In order to investigate the localization of these messengers, we performed *in situ* hybridization on whole embryos. Although all three zfERs were detected by real-time RT-PCR, we failed to detect zfERα mRNA in the brain by *in situ* hybridization until 14 dpf (Fig. 2A and 2B), suggesting either that its expression in brain is low and diffuse, or that the mRNAs detected by PCR correspond to an expression occurring outside the brain. Importantly, the detection of a zfERα positive signal at 48 hpf within a region expressing *prox1*, an early liver marker (data not shown), confirms the probe efficiency. At stage 14 dpf, a few positive cells were detected in the forebrain (data not shown), and animals at 21 dpf exhibit two restricted zfERα positive cell populations in the ventral telencephalon and hypothalamus (Fig. 2C).

In contrast, both zfERβ1 and zfERβ2 mRNA expressing cells were observed during the pharyngula period (32 hpf, data not shown) in the forebrain, in a very small cell population of the anterior diencephalon. This expression increases and is clearly visible at 36 hpf (Fig. 2G). Positive cells form two symmetrical cell clusters located laterally slightly lateral to the midline. The expression of both zfERβ1 and zfERβ2 increases at 48 hpf and 60 hpf (Fig. 2D, 2E, 2H). At 48 hpf, a second positive cell population expressing zfERβ2 was detected more posteriorly, in the presumptive hypothalamus (Fig. 2H, 2I). These whole-mount *in situ* hybridization data indicate that zfERβ2 messengers exhibit wider expression pattern compared to zfERβ1.

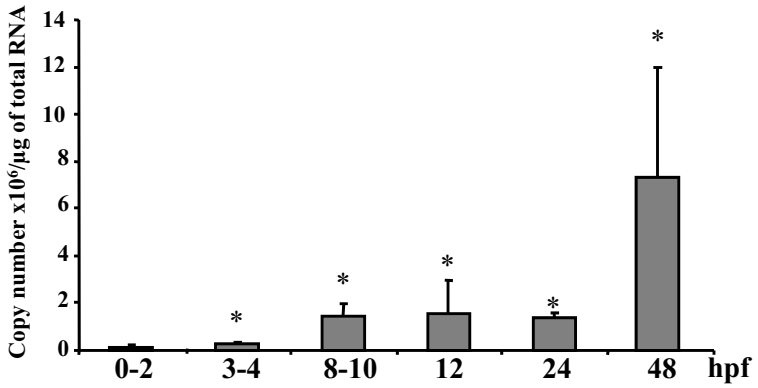


Figure 3: Expression of aromatase B messengers during early development as determined by quantitative PCR. For each experiment, n=100 ± 5 embryos were used for each stage. Data are the mean of three independent layings and results are expressed as the number of copies /µg of total RNA. Results were analyzed using the non parametric Mann-Whitney U test (ranking method) of the Statistica software (Statsoft, France). Asterisks (*) indicate significant differences with stage 0 hpf ($p<0.05$).

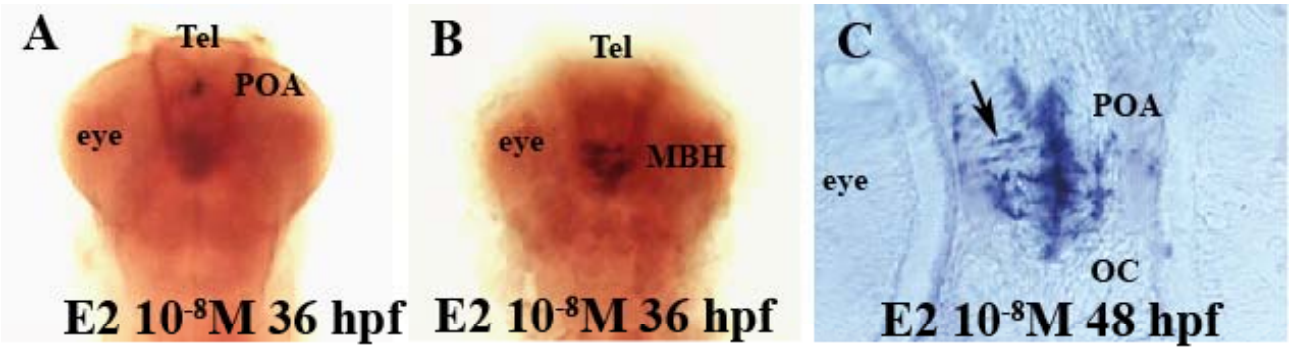


Figure 4: Expression of aromatase B messengers in the forebrain of zebrafish of 36 hpf and 48hpf. To detect messengers encoding aromatase B, embryos had to be treated with estradiol (E2) (10^{-8}M). Panels A and B show a significant staining localized in preoptic area (POA) and hypothalamus (MBH). Panel C is a transverse cryostat section in the preoptic area showing abundant AroB staining along the midline in radial glial cells and their processes.

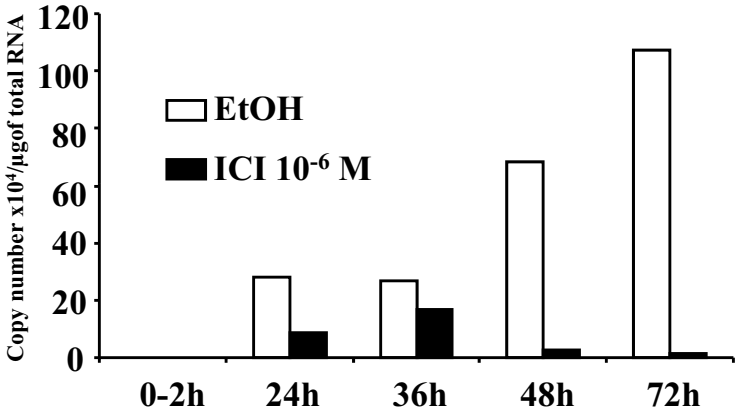


Figure 5: An $ICI_{182,780}$ treatment severely reduces aromatase B expression in developing zebrafish. At each stage, 100 ± 5 embryos treated with $ICI_{182,780}$ (10^{-6} M) or ethanol (EtOH, vehicle control) were used for RNA preparation and quantitative RT-PCR experiments. Shown is a representative profile from five different experiments performed on independent samples, yielding the same results. Data are expressed as in Figures 1 and 3.

Early expression of aromatase B transcripts

We also followed the expression of AroB during zebrafish development through quantitative RT-PCR experiments on pools of embryos at 2, 4, 8, 12, 24 and 48 hpf. These experiments reveal that very AroB messengers may be maternally inherited, with around 5.10^5 mRNA copies present per embryo over the first stages (Fig. 3). The amounts of messengers detected then increase to around $1.5x10^6$ copies until 24 hpf. At 48 hpf, at the beginning of pharyngula stage, a notable increase in the expression of AroB transcripts occurs ($4.5x10^6$ copies per µg total RNA). Importantly, this increased expression timely corresponds to that observed for the three zfERs.

Using whole-mount *in situ* hybridization, we failed to detect aromatase B mRNAs in the head of embryos at these early stages unless they were treated with estradiol (10^{-8}M). Under these latter conditions, starting at 36hpf, AroB expression is detected within embryos, first in the mediobasal hypothalamus and preoptic area (data not shown and Fig. 4A and 4B), and then in the telencephalon (at 48 hpf, data not shown). As already documented in adults and older embryos, this expression only corresponds to radial glial cells and their long radial processes as shown by in situ hybridization (Fig. 4C) and immunohistochemistry (data not shown).

Blocking ER action causes disruption of the early expression of aromatase B

In order to investigate whether aromatase B expression at these early stages relies on the presence of zfERs, we monitored the amounts of corresponding messengers present in embryos treated with $ICI_{182,780}$, an ER antagonist, or untreated (ethanol vehicle). Although this experiment was repeated several times (5 times), the limited number of eggs from the same batch did not allow performing these experiments at all time points in each experiment. Figure 5 therefore depicts results originating from one representative experiment. These quantitative RT-PCR data show that $ICI_{182,780}$ strongly reduces the

amounts of aromatase B present in embryos, at all development stages tested (24, 36, 48 and 72 hpf). This therefore indicates that zfERs are involved in the regulation of aromatase B expression during the development of zebrafish.

Discussion

Recent data have documented the expression and regulation of AroB in the brain of fish and it is now admitted that AroB expression is restricted to radial glial cells (Forlano et al. 2001; Kallivretaki et al. 2007; Marsh et al. 2006; Menuet et al. 2003; Menuet et al. 2005; Pellegrini et al. 2007; Strobl-Mazzulla et al. 2005). In addition, there is substantial evidence to show that AroB expression is strongly up-regulated by estrogens and aromatizable androgens (Halm et al. 2002; Kishida et al. 2001; Menuet et al. 2005). Nevertheless, there is still little information on the potential implication of the different zfERs during the early development of zebrafish. We therefore conducted experiments aiming to characterize the chronology of zfER expression in parallel to that of AroB and the establishment of AroB responsiveness to E2.

The present study shows that elevated amounts of zfERβ2 mRNA are maternally inherited, as already observed by real-time RT-PCR or RNAse protection (Bardet et al. 2002; Lassiter et al. 2002; Tingaud-Sequeira et al. 2004). Quantities of maternally inherited zfERα and zfERβ1 mRNA are in contrast much lower. Importantly, even if mRNAs encoding zfERα were detected at this stage by real time RT-PCR, this form of zfER was not present in the brain, but rather in the liver, as indicated in experiments using a riboprobe against prox1 (data not shown), the earliest marker of embryonic liver in zebrafish (Shin et al. 2007). Such an expression of zfERα in the liver is probably related to the fact that this tissue is, in all oviparous species, a target tissue for E2 (Tata and Smith 1979). In these species, one of the

main roles of E2 is indeed to stimulate the expression of vitellogenin, which is the precursor of egg yolk protein. Importantly, this induction is preceded by an increase in ER mRNA in the liver in fish (Flouriot et al. 1996; Pakdel et al. 1991).

The expression of zfERβ2 in eggs and early embryos, before the onset of zygotic transcription, suggests that this form of zfERβ exerts important roles very early in the development. For instance, the expression of zfERβs early in the brain of embryo suggests that zfERβs could be involved in the developing central nervous system. Data observed in Tilapia also indicate that ERβ has an important role in brain development by influencing migration and neuronal survival (Tsai et al. 2003). In mice, the invalidation of ERβ involves a regional neuronal hypocellularity especially in the cerebral cortex and an abnormal migration of new neurones (Wang et al. 2003).

The precocious expression of zfER in the telencephalon, the preoptic area and hypothalmus is in line with their high abundance of zfER in the same regions of the adult brain (Menuet et al, 2002). Nevertheless, the zfER isoforms are not expressed in the same region at the same stage of development. For example, zfERβ mRNA are more widespread, as shown the presence in the presumptive hypothalamus this is also the case in adult (Menuet et al. 2002).

During the development of zebrafish brain, we found that AroB mRNA levels remain low during the first stage of development and strongly increase between 24 and 48 hpf. This is in agreement with a previous study based on real time-RT-PCR, also using zebrafish (Sawyer et al. 2006). However, in accordance with our previous work (Menuet et al. 2005) AroB mRNAs remain undetectable in the brain using whole-mount in situ hybridization at all these early stages. Nevertheless, as already documented, treating zebrafish embryos with E2 causes a dramatic increase in AroB expression that becomes detectable at the messenger level by in situ hybridization and at the protein level by immunohistochemistry as early as 36 hpf. These data strongly suggest that zfERs become fully functional in the brain between

24 and 36 hpf, corresponding to the spatio-temporal profile reported here. This is in line with the fact that we have previously shown, using different approaches, that AroB estrogenic up-regulation requires the mandatory presence of ERs (Le Page et al. 2008; Le Page et al. 2006; Menuet et al. 2005).

The detection of zfERβ1 and zfERβ2, but not zfERα in the brain at this stage, suggests that zfERβs could be the ER forms mediating early expression of AroB in the brain. However, we cannot totally exclude the fact that zfERα might also be expressed in the neuroendocrine regions of the embryonic brain, from 32-36 hpf to two weeks, but at levels unsufficient for detection by whole-mount *in situ* hybridization. Similar caution has also to be taken concerning the lack of expression of AroB expression before 36h. Although upon E2 treatment, AroB expression is found in the radial glial cells of regions expressing ERβ (Menuet et al. 2005), zfERβ seems to be expressed more laterally than AroB and, consequently, does not correspond to radial glial cells. Such a mismatch between ER expression and AroB has already been documented in adult trout and zebrafish (Menuet et al. 2003; Menuet et al. 2005). The only explanations are either the involvement of unconventional ER form (Toran-Allerand 2004) that would be sensitive to $ICI_{182,780}$ or a low undetectable expression that would nevertheless be sufficient to trigger AroB expression.

These data indicate that, although expressed early during development, the expression patterns of all three zfERs present major differences. This probably reflects the fact that these receptors mediate specific functions in the “whole embryo”, as observed in the brain of tilapia (Tsai et al. 2003). While there is no information concerning the different roles of ERs in the brain, these data are in favour of distinct central functions which depend on the stage of development and the precise localisation. Furthermore, some studies showed a differential expression of each ER isoform according to the organ in which they are expressed and the

isoform of ER. For example, in the liver of the zebrafish, ERα is highly regulated by E2, whereas ERβs are either not regulated or down regulated (Menuet et al. 2004). In contrast, in the ovary, all ER are strongly expressed after a peak of E2 (Sabo-Attwood et al. 2004). Importantly, in the tilapia, depending upon the stage of development, the water temperature differentially affects the expression of each ER forms and AroB in the developing brain. For instance, at one stage, both AroB and ERα amounts are enhanced, whilst at another it is AroB and ERβ which are affected (Tsai et al. 2003; Wang and Tsai 2006). These data suggest that the expression of both AroB and ERs, differentially regulated according to the temperature and to the developmental period, could be related to "brain-sex differentiation". It is indeed known that temperature can influence the sexual differentiation, as it is also the case in zebrafish (Uchida et al. 2004). Although the mechanisms underlying this differentiation at the brain level are not known, they most likely involve modulation of processes in the brain, as suggested in the pejerrey (Strobl-Mazzulla et al. 2008). Interestingly, our results show that a significant expression of zfERα is detected in the neuroendocrine region, starting at 14 dpf. Since this period corresponds to the beginning of the sexual differentiation of zebrafish brain (15-22 dpf), our results therefore suggest that zfERα may participate in these mechanisms.

Our results also suggest that E2 is already present in zebrafish embryos to activate zfERs at these early stages. In some teleost species, estradiol and testosterone can be found in eggs (de Jesus and Hirano 1992; Hines et al. 1999). On the other hand, testosterone is also able to induce aromatase B expression in vivo during precocious development (Gelinas et al. 1998; Lassiter et al. 2002). Since testosterone is unable to directly activate the *cyp19a1b* promoter, but requires aromatization to up-regulate AroB (Mouriec et al., unpublished), this suggests that zebrafish would already presents a brain aromatase activity at 24-48 hpf. Therefore, whether the source of E2 is of maternal origin or results from a de novo synthesis by the

embryo is still an open question. It will therefore be of importance to monitor the aromatase activity present within zebrafish embryo at these stages, and to follow the expression of the other enzymes involved in the synthesis of steroids during the development.

In conclusion, this study shows a close parallelism between the changes in AroB expression and that of ERs, and strongly suggests that the early basal expression of AroB between 24-36h already relies, at least in part, upon the expression of functional zfERs. Furthermore, we evidenced a different spatiotemporal expression of zfERs during brain development, suggesting that each form may endorse specific roles.

	Primer sequences	concentration	Size of amplified fragment
zfERα	**Fw** : **5'**-CTGGAGATGCTGGACGCTCA- **3'** **Rev** :**5'**- GCTGCAGCTCCTCCTCTTGG-**3'**	**600nM**	**140**
zfERβ1	**Fw**: **5'**- TGATCCTGCTCAACTCTAATAAC-**3'** **Rev**: **5'**-TCCAGCAGATTCAGCACCTTCCC-**3'**	**600nM**	**88**
zfERβ2	**Fw** : **5'**-TGATCCTCCTGAACTCCAACATG-**3'** **Rev** : **5'**-TCCAGCAGACACAGCAGCTTGGA-**3'**	**200nM**	**88**
AroB	**Fw 5'**ACTAAGCAAGTCCTCCGCTGTGTACC-**3'** **Rev : 5'-**TTTAAACATACCGATGCATTGCAGACC-**3'**	**100nM**	

Table 1: Sequences of the oligonucleotides used in real-time PCR. The primer concentration used and the length of the amplified fragment are indicated.

Materials and Methods

Animals and treatment

Animals were treated in agreement with the European Union regulations concerning the protection of experimental animals. Zebrafish embryos were raised in our facilities in recirculated water kept at 28.5°C and spawned under standard conditions. For developmental studies and chemical treatments (E2 and $ICI_{182,780}$, Sigma), embryos were kept in large Petri dishes containing embryonic medium (zebra.sc.edu/guides.html) in an incubator at 28.5°C, and the media containing hormones or anti-hormones were renewed every 24 h. The stage of the embryos was determined following the morphological features routinely used (Kimmel et al. 1995).

RNA extraction

Total RNA was extracted using the Trizol™ reagent (Invitrogen). Reverse transcription was performed in presence of the Mouse Moloney Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT) according to the manufacturer's procedure (Promega). Briefly, two micrograms of total RNA were reverse transcribed for 1h at 37°C in 25µl reaction mixture containing 1µg random hexamers (Promega, France), 0.5mM dNTPs, 25U RNAsin (Promega), 1X MMLV-RT buffer, and 200U MMLV-RT (Promega).

Quantitative real time PCR

Primers (sequence within Table 1) design was performed with the Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Rozen and Skaletsky 2000) using the following conditions: primer Tm around 60°C, primer GC% included between 30% and 70%, and the length of the PCR product between 70 bp and 150 bp. Primer sets targeting zfERβ1 and zfERβ2 amplification were designed within spanning introns. Real time PCR was carried out on an iCycler MyiQ (Bio-Rad, France), using the 2X iQ SYBR Green supermix

(Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Briefly, a 20µl reaction mix was set up with 5µl of the diluted $1/5^{e}$ reverse transcribed sample, 200 to 600nM primers (see Table 1), and 10µl 2X reaction buffer. Thermal cycling was 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by forty two-steps cycles of 15 sec 95°C and 1 min 60°C. Serial 1/5 dilution of plasmid carrying the target DNA fragment (320 to 5.10^{6} copies) were analyzed to build standard curves from which transcript copy number was determined. Specific amplification of single products was controlled through the establishment of melting curves. PCR amplifications were analyzed using the MyiQ (version 1.0) optical system software (BIORAD). PCR reactions were run in duplicate on three independent samples (pools of 100 embryos at stage 0-2, 3-4, 8-10, 12, 24 or 48 hpf). Samples not exposed to reverse transcriptase were used as negative control to monitor DNA contamination.

Probe synthesis and whole-mount in situ hybridization

To detect zfER smRNA, specific Dig-labelled riboprobes were generated and whole-mount *in situ* hybridization were performed as previously described (Menuet et al. 2002; Menuet et al. 2005). Embryos were mounted on observation chambers as described in the zebrafish book (zebra.sc.edu/guides.html) and photographed with an Olympus Provis upright photomicroscope equipped with the Cell software.

Acknowledgements

We wish to acknowledge the staff of the zebrafish facilities (INRA-SCRIBE, IFR 140). We thank Raphaël Métivier and Marie-Lise Thieulant for critical reading of the manuscript. This work was funded by the CNRS and the Ministry of Research and Technology (ANR). Karen Mouriec is supported by the Ministry of Research and Technology.

References

Balthazart J, Ball GF. 1998. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). Trends Neurosci 21(6):243-249.

Bardet PL, Horard B, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Vanacker JM. 2002. Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (Danio rerio). J Mol Endocrinol 28(3):153-163.

Blazquez M, Piferrer F. 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (Dicentrarchus labrax). Mol Cell Endocrinol 219(1-2):83-94.

Callard GV, Tchoudakova A. 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. J Steroid Biochem Mol Biol 61(3-6):387-392.

Callard GV, Tchoudakova AV, Kishida M, Wood E. 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. J Steroid Biochem Mol Biol 79(1-5):305-314.

de Jesus EG, Hirano T. 1992. Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones, and sex steroids during early development of the chum salmon, Oncorhynchus keta. Gen Comp Endocrinol 85(1):55-61.

Filby AL, Tyler CR. 2005. Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a, and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (Pimephales promelas). Biol Reprod 73(4):648-662.

Filby AL, Tyler CR. 2007. Appropriate 'housekeeping' genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. BMC Mol Biol 8:10.

Flouriot G, Pakdel F, Valotaire Y. 1996. Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. Mol Cell Endocrinol 124(1-2):173-183.

Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass AH. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. J Neurosci 21(22):8943-8955.

Gelinas D, Pitoc GA, Callard GV. 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. Mol Cell Endocrinol 138(1-2):81-93.

Halm S, Pounds N, Maddix S, Rand-Weaver M, Sumpter JP, Hutchinson TH, Tyler CR. 2002. Exposure to exogenous 17beta-oestradiol disrupts p450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 60(3-4):285-299.

Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. Proc Natl Acad Sci U S A 97(20):10751-10756.

Hines GA, Boots LR, Wibbels T, Watts SA. 1999. Steroid levels and steroid metabolism in relation to early gonadal development in the tilapia Oreochromis niloticus (Teleostei: cyprinoidei). Gen Comp Endocrinol 114(2):235-248.

Kallivretaki E, Eggen RI, Neuhauss SC, Kah O, Segner H. 2007. The zebrafish, brain-specific, aromatase cyp19a2 is neither expressed nor distributed in a sexually dimorphic manner during sexual differentiation. Dev Dyn 236(11):3155-3166.

Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn 203(3):253-310.

Kishida M, McLellan M, Miranda JA, Callard GV. 2001. Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (Danio rerio). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 129(2-3):261-268.

Lassiter CS, Kelley B, Linney E. 2002. Genomic structure and embryonic expression of estrogen receptor beta a (ERbetaa) in zebrafish (Danio rerio). Gene 299(1-2):141-151.

Le Page Y, Menuet A, Kah O, Pakdel F. 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. Mol Reprod Dev:in press.

Le Page Y, Scholze M, Kah O, Pakdel F. 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. Environ Health Perspect 114(5):752-758.

Marsh KE, Creutz LM, Hawkins MB, Godwin J. 2006. Aromatase immunoreactivity in the bluehead wrasse brain, Thalassoma bifasciatum: immunolocalization and co-regionalization with arginine vasotocin and tyrosine hydroxylase. Brain Res 1126(1):91-101.

Martinez-Cerdeno V, Noctor SC, Kriegstein AR. 2006. Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. Eur J Neurosci 24(12):3475-3488.

Menuet A, Anglade I, Le Guevel R, Pellegrini E, Pakdel F, Kah O. 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. J Comp Neurol 462(2):180-193.

Menuet A, Le Page Y, Torres O, Kern L, Kah O, Pakdel F. 2004. Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ERalpha, ERbeta1 and ERbeta2. J Mol Endocrinol 32(3):975-986.

Menuet A, Pellegrini E, Anglade I, Blaise O, Laudet V, Kah O, Pakdel F. 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. Biol Reprod 66(6):1881-1892.

Menuet A, Pellegrini E, Brion F, Gueguen MM, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. J Comp Neurol 485(4):304-320.

Pakdel F, Feon S, Le Gac F, Le Menn F, Valotaire Y. 1991. In vivo estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. Mol Cell Endocrinol 75(3):205-212.

Pasmanik M, Callard GV. 1985. Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. Gen Comp Endocrinol 60(2):244-251.

Pellegrini E, Mouriec K, Anglade I, Menuet A, Le Page Y, Gueguen MM, Marmignon MH, Brion F, Pakdel F, Kah O. 2007. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. J Comp Neurol 501(1):150-167.

Peterson RS, Lee DW, Fernando G, Schlinger BA. 2004. Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. J Comp Neurol 475(2):261-269.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods in molecular biology (Clifton, NJ 132:365-386.

Sabo-Attwood T, Kroll KJ, Denslow ND. 2004. Differential expression of largemouth bass (Micropterus salmoides) estrogen receptor isotypes alpha, beta, and gamma by estradiol. Mol Cell Endocrinol 218(1-2):107-118.

Sawyer SJ, Gerstner KA, Callard GV. 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: gene specific tissue distribution, sex differences,

developmental programming, and estrogen regulation. Gen Comp Endocrinol 147(2):108-117.

Shin D, Shin CH, Tucker J, Ober EA, Rentzsch F, Poss KD, Hammerschmidt M, Mullins MC, Stainier DY. 2007. Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish. Development 134(11):2041-2050.

Steinke D, Hoegg S, Brinkmann H, Meyer A. 2006. Three rounds (1R/2R/3R) of genome duplications and the evolution of the glycolytic pathway in vertebrates. BMC Biol 4:16.

Strobl-Mazzulla PH, Lethimonier C, Gueguen MM, Karube M, Fernandino JI, Yoshizaki G, Patino R, Strussmann CA, Kah O, Somoza GM. 2008. Brain aromatase (Cyp19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish Odontesthes bonariensis: Neuroanatomical and functional relations. Gen Comp Endocrinol 158(2):191-201.

Strobl-Mazzulla PH, Moncaut NP, Lopez GC, Miranda LA, Canario AV, Somoza GM. 2005. Brain aromatase from pejerrey fish (Odontesthes bonariensis): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. Gen Comp Endocrinol 143(1):21-32.

Tata JR, Smith DF. 1979. Vitellogenesis: a versatile model for hormonal regulation of gene expression. Recent progress in hormone research 35:47-95.

Tchoudakova A, Callard GV. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. Endocrinology 139(4):2179-2189.

Tingaud-Sequeira A, Andre M, Forgue J, Barthe C, Babin PJ. 2004. Expression patterns of three estrogen receptor genes during zebrafish (Danio rerio) development: evidence for high expression in neuromasts. Gene Expr Patterns 4(5):561-568.

Tong SK, Chung BC. 2003. Analysis of zebrafish cyp19 promoters. J Steroid Biochem Mol Biol 86(3-5):381-386.

Toran-Allerand CD. 2004. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? Endocrinology 145(3):1069-1074.

Trant JM, Gavasso S, Ackers J, Chung BC, Place AR. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (Danio rerio). J Exp Zool 290(5):475-483.

Tsai CL, Chang SL, Wang LH, Chao TY. 2003. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (Oreochromis mossambicus) brain. J Neuroendocrinol 15(1):97-102.

Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T. 2004. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 137(1):11-20.

Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. 2003. Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. Proc Natl Acad Sci U S A 100(2):703-708.

Wang LH, Tsai CL. 2006. Photoperiod influences the ontogenetic expression of aromatase and estrogen receptor alpha in the developing tilapia brain. Gen Comp Endocrinol 145(1):62-66.

Résultats – Chapitre 2, Partie 2

Androgens upregulate *cyp19a1b* (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors

Karen Mouriec, Marie-Madeleine Gueguen, Christelle Manuel, Frédéric Percevault, Marie-Lise Thieulant, Farzad Pakdel, Olivier Kah.

BIOLOGY OF REPRODUCTION, accepted for publication

L'expression de l'aromatase B, ainsi que sa régulation, présentent des particularités intrigantes chez les poissons téléostéens. Par exemple, cette protéine est très fortement exprimée dans les cellules gliales radiaires, et cette expression est stimulée par l'œstradiol (E2), qui est le produit de la réaction catalysée par cette enzyme. Au niveau transcriptionnel, cette régulation implique la liaison de récepteurs aux œstrogènes (ERs) sur un ERE présent sur le promoteur du gène *cyp19a1b* codant l'aromatase B, mais également, le recrutement d'un facteur glial spécifique sur son élément de réponse. Le promoteur de ce gène contenant également un élément de réponse potentiel pour les récepteurs des androgènes (ARs), nous nous sommes donc intéressés à la régulation de l'aromatase B par ces hormones.

Nous avons ainsi montré *in vivo* que l'aromatase B est régulée dans les cellules gliales radiaires par la testostérone (T), un androgène aromatisable. A l'aide d'expériences *in vitro*, nous démontrons que cette régulation implique les ERs, suggérant donc que cet effet de la T reposerait sur sa conversion en E2. De façon plus surprenante, nous avons observé que la dihydrotestostérone (DHT), un androgène non aromatisable, est également capable de stimuler l'expression de l'aromatase B. Comme dans le cas de la T, cette régulation implique les ERs, et non les ARs. L'utilisation dans nos expériences de deux autres androgènes non aromatisables, la 11-kétotestostérone (11-KT) et l'alpha-androstan-3 alpha 17 beta-diol (βdiol), nous a conduit à suggérer que la forte induction de l'aromatase B par la DHT repose, en fait, sur sa conversion en βdiol, un métabolite de la DHT présentant une forte affinité pour les ERs.

Ces résultats apportent de nouvelles informations sur la régulation du gène *cyp19a1b* par les stéroïdes sexuels. Nous montrons que certains androgènes aromatisables, comme la T et la DHT, stimulent l'expression de l'aromatase *via* les ERs. Les androgènes non aromatisables, tels que la 11-KT, sont sans effets sur la régulation directe du gène. Ces données permettent de mieux comprendre la très forte expression de l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires des poissons adultes, chez lesquels, les niveaux de stéroïdes circulants sont élevés.

Androgens upregulate *cyp19a1b* (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors

Karen Mouriec, Marie-Madeleine Gueguen, Christelle Manuel, Frédéric Percevault, Marie-Lise Thieulant, Farzad Pakdel, Olivier Kah

Neurogenesis And Œstrogens,

UMR CNRS 6026, IFR 140, Université de Rennes 1, Rennes, France

Correspondence: Dr. Olivier Kah.

Université de Rennes 1

Neurogenesis AND Œstrogens, UMR CNRS 6026, IFR 140

Université de Rennes 1, Rennes, France

+33-2 23 23 67 65

+33-2 23 23 67 94

olivier.kah@univ-rennes1.fr

ABSTRACT

The brain of teleosts is known for its strong aromatase B expression that exhibits unique features compared to other vertebrates. Among them is the high sensitivity of aromatase B (the product of the *cyp19a1b* gene) to estrogens. This regulation involves binding of estrogen receptors on an estrogen-responsive element (ERE) located within the *cyp19a1b* promoter. Interestingly, this promoter also contains putative androgen-responsive elements (AREs). We therefore investigated *in vivo* and *in vitro* the roles that androgens may have on the regulation of this gene. Using immunohistochemistry and real time PCR on zebrafish embryos, we found that *cyp19a1b* is up-regulated by testosterone, an aromatizable androgen, and by dihydrotestosterone, a non aromatizable androgen. This suggested that the *cyp19a1b* gene might be directly regulated by androgen receptors (ARs). This hypothesis was evaluated by *in vitro* transfection experiments using a luciferase reporter gene placed under the control of a 3 kb fragment of the proximal *cyp19a1b* promoter, containing both ERE and predicted ARE. Interestingly, although able to activate control promoters such as the MMTV, zebrafish AR failed to induce the *cyp19a1b*-luciferase reporter. In contrast, zebrafish ERs were able to stimulate the reporter activity upon treatment with androgens, as well with 5 alpha-androstan-3 alpha 17 beta-diol (βdiol), which is a known metabolite of DHT. The blockade of these regulations by the pure anti-estrogen $ICI_{182,780}$ further confirmed the involvement of estrogen receptors in these processes. These data thus suggest that the androgenic regulation of *cyp19a1b* does not involve AR but rather a possible aromatization of T in E2 or a conversion of DHT into 17 βdiol.

INTRODUCTION

Estradiol (E2) is a powerful steroid exerting pleiotropic effects in both embryos and adults of vertebrates. Estrogens are mostly described for their roles in regulating sex cycle and reproductive behavior. There is however growing evidence for additional roles of these hormones in neuroprotection and in neurotrophic functions which concern areas located outside the classical "reproductive brain" (Behl, 2002; Garcia-Segura *et al*., 1999; Peterson *et al*., 2007). For many years, estradiol has been mainly regarded as a circulating hormone produced by the gonads, but local synthesis in other tissues such as bone, uterus, adipose tissue and brain, also occurs (Lephart, 1996). Although brain constitutes a major target organ for circulating estrogens, many effects exerted by these hormones in the central nervous system (CNS) result from a local production of E2. This synthesis results from the aromatization of testosterone (T) by the cytochrome P450 aromatase, more commonly called aromatase. This enzymatic complex includes two components: the cytochrome P450 aromatase and a flavoprotein, the NADPH-cytochrome P450 reductase. In mammals, during embryonic and perinatal development of the CNS, the most depicted role of locally synthesized estradiol is its important influence on brain sexually dimorphic structures. These periods correspond to phases in which the aromatization of testosterone secreted by developing male gonad is maximal (Naftolin, 1994). Indeed, the aromatization of testosterone produced by the developing testis during a critical period of development causes irreversible sexual dimorphism of some brain structures, such as preoptic area or mediobasal hypothalamus. This process is illustrated by the irreversible masculinization of cerebral structures, such as preoptic area and hypothalamus, when E2 or T are injected in newly born female rats (McCarthy *et al*., 2002). Importantly, this mechanism does not appear to occur in fishes, where sex differentiation has only a weak genetic component.

The brain aromatase of teleost fishes exhibits unique features, as compared to mammalian and birds' one. First, adult fish exhibit extraordinarily high levels of brain aromatase activity, approximately 100 to 1000 fold more than what is detected in similar brain regions in mammals (Pasmanik and Callard, 1985). In contrast to mammals, in which aromatase activity declines in adulthood following a maximum during embryonic and perinatal periods, the expression of brain aromatase in teleost is low, and increases progressively until adulthood. Furthermore, most teleost fishes are characterized by the existence of two *cyp19a1* genes encoding aromatase, due to the specific genome duplication of this evolutionary branch (Steinke *et al*., 2006). These two genes have different expression patterns: the *cyp19a1a* gene which encodes aromatase A is mainly expressed in the gonads, whilst the *cyp19a1b* gene encoding aromatase B is expressed in the brain (Chiang *et al*., 2001; Kwon *et al*., 2001; Tchoudakova *et al*., 2001). This contrasts with mammals and birds in which the tissue specific expression of aromatase, encoded by a single gene, is driven by a specific transcription initiating from one of multiple promoters (Conley and Hinshelwood, 2001). Finally, the pattern of expression of aromatase in brain also strikingly differs between adult mammals and teleosts. Indeed, in contrast to mammals and birds in which the enzyme is mostly expressed in neurons in limbic and neuroendocrine regions (Balthazart and Ball, 1998; Zhao *et al*., 2007), its expression in teleosts is restricted to radial glial cells which are mainly present in forebrain regions such as the olfactory bulbs, telencephalon, preoptic area and hypothalamus (Forlano *et al*., 2001; Menuet *et al*., 2003; Pellegrini *et al*., 2007).

Radial glial cells are characterized by a small nucleus, which are adjacent to the brain ventricle, and by long processes terminating by end feet at the brain surface (Rakic, 1978). Interestingly, although initially thought to only provide a scaffold for neuron migration, radial glial cells are now considered as progenitor cells during embryogenesis (Gotz *et al*., 2002). Indeed, upon asymmetric division, these cells divide in a new radial glial cell and a second

cell that migrates and finally differentiates into neuron. At the end of the embryonic neurogenesis, the processes then retract and radial glial cells differentiate into astrocytes (Noctor *et al*., 2002). In contrast to mammals in which radial glial cells disappear following embryonic neurogenesis, they persist in the brain of adult fish, and were recently demonstrated to function as progenitor cells in the adult brain of zebrafish (Pellegrini *et al*., 2007). The strong expression of aromatase B in radial glial cells suggests the existence of a high local production of E2. Importantly, E2 has well documented roles in the control of cell fate and neurogenesis in mammals. It is therefore speculated that E2 can be linked with persistent neurogenesis and very high neurogenic activity which occurs throughout lifespan in fishes, but which is restricted to limited regions in mammals (Mouriec *et al*., 2008). Consequently, it is of importance to further determine the physiological role of such an abundance of aromatase B in fish brain; and to understand the still poorly described mechanisms of regulation of the *cyp19a1b* gene.

In mammals, aromatase is up-regulated by androgens, whilst aromatase regulation mainly depends upon estrogens in birds (Roselli, 2007; Zhao *et al*., 2007). In fish brain, aromatase B transcripts and protein are strongly up-regulated by E2, as determined in treated zebrafish embryos through PCR, *in situ* hybridization and immunohistochemistry experiments (Kishida and Callard, 2001; Menuet *et al*., 2005; Trant *et al*., 2001). Importantly, the cotreatment of zebrafish larvae with estradiol and $ICI_{182,780}$, an estrogen receptor (ER) antagonist, blocks this estradiol-induced over-expression of aromatase B. This therefore suggests that this process, only observed in radial glial cells (Menuet *et al*., 2005), is mediated through ERs (Menuet *et al*., 2005). Teleosts possess three genes encoding ERs (ERα, ERβ1 and ERβ2) (Hawkins *et al*., 2000; Menuet *et al*., 2002), which exhibit different expression pattern and properties, but which are all able to induce a reporter gene placed under the control of an estrogen response element (ERE) upon treatment with E2 (Menuet *et al*., 2005).

The involvement of these transcription factors in controlling the *cyp19a1b* gene activity is further illustrated by *in vitro* studies using luciferase reporter gene placed under the control of the zebrafish *cyp19a1b* promoter. Interestingly, when cotransfected with plasmids encoding zebrafish ER (zfER), the activity of this reporter construct was strongly induced by E2, only in neuroglial lines (differentiated P19 cells and U-251 MG human astrocytes cell line). Moreover, a deletion analysis of the *cyp19a1b* promoter demonstrated that the induction of the *cyp19a1b* reporter gene in the presence of zfER and E2 requires both the ERE and a sequence called GxRE recruiting a neuroglial factor (Le Page *et al*., 2008; Le Page *et al*., 2006; Menuet *et al*., 2005). These experiments therefore indicate that a "neuroglial context", including specific factors, is necessary for the occurrence of an estrogenic regulation of the *cyp19a1b*-luciferase reporter gene (Cheshenko *et al*., 2007; Le Page *et al*., 2006; Menuet *et al*., 2005).

Altogether, these data indicate that the positive regulatory loop of aromatase B gene by E2 might be due to a local conversion of T into E2 in teleost brain. Furthermore, it is possible that the *cyp19a1b* gene could also be under the control of androgens, since its promoter contains a potential androgen response element (ARE) (Tong and Chung, 2003), whose functionality, however, remains to be ascertained. In order to corroborate these hypotheses, we therefore decided to examine the mechanisms of regulation of the *cyp19a1b* gene both *in vivo* and *in vitro*, using a combination of real time RT-PCR, immunohistochemistry and cell transfection experiments.

MATERIALS AND METHODS

Animals and treatments

Animals were treated in agreement with the European Union regulations concerning the protection of experimental animals. Zebrafish eggs were treated immediately after laying with E2 (Sigma E8875), T (Sigma T-1500), Dihydrotestosterone (DHT; Sigma D-5027), 11α-ketotestosterone (11-KT; Sigma K-8250), 5α-androstane-3β, 17-βdiol (βdiol; Sigma A-7630) at a final 10^{-6} M to 10^{-8} M concentration. All hormones were solubilized in ethanol (EtOH), which was used as a vehicle control. Final concentration of ethanol in water was kept constant at 0.1%. Embryos were treated for 72 hrs in Petri dish, and raised at 28.5°C. Whenever treatments exceeded 24 hrs, the water containing the hormones was renewed every 24 hrs.

Immunohistochemistry on zebrafish larvae

After 72 hrs of treatment, larvae were fixed overnight at 4°C in a saline phosphate buffer (PBS pH 7.4) containing 4% paraformaldehyde, then immersed in sucrose and embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe) to obtain frozen sections (12µM). After blocking endogenous peroxidase activity in PBS containing 0.3% H_2O_2 for 45 minutes, tissue sections were incubated for 1 hour in a saturating PBS solution containing 0.2% Triton X-100 and 0.5% milk powder. Then, tissue sections were incubated overnight with a specific affinity purified antibody directed against zebrafish aromatase B (Menuet *et al*., 2005; Pellegrini *et al*., 2007) diluted at a 1:500 ratio in PBS containing 0.5% milk powder. After rinsing, tissue sections were sequentially incubated for 90 min with a secondary biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:1500 in PBS containing 0.5% milk; Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France) and with a complex streptavidin-peroxydase (1:1500 in PBS containing 0.5% milk;Tebu-Bio) for 90 min. Brain aromatase immunoreactivity was revealed through a nickel intensification protocol (Shu *et al*., 1988). Sections were finally mounted in PBS/glycerol (v/v) and observed

Primers		Sequences
aromatase B	*Forward*	5'-ACTAAGCAAGTCCTCCGCTGTGTACC-3'
	Reverse	5'-TTTAAACATACCGATGCATTGCAGACC-3'
Zf EFI	*Forward*	5'-AGCAGCAGCTGAGGAGTGAT-3'
	Reverse	5'-CCGCATTTGTAGATCAGATGG-3'
Zf GAPDH	*Forward*	5'-GAGCACCAGGTTGTGTCCA-3'
	Reverse	5'-TGTCATACCATGTGACCAGCTT-3'

Table 1: Sequences of the oligonucleotides used for real-time PCR.
The primer concentration used is indicated.

with an Olympus Provis microscope equipped with a DP71 camera. Images were obtained with the Olympus Cell software.

Quantitative evaluation of zebrafish cyp19a1b transcripts

Following 72 hrs of treatment, pools of larvae (100) exposed to the same hormonal treatment were rapidly frozen and lysed in 1mL of Trizol™ reagent (Invitrogen) through sonication. Total RNA were then extracted according to the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed for 75 minutes at 37°C, using 2µg of RNA, 5mM of hexamer oligonucleotides, 2.5mM dNTP and 100U of MMLV-RT (Promega). Quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were performed using a MyiQ apparatus (BioRad), using iQ SYBR-Green supermix (BioRad) and primers shown in **Table 1**. *GAPDH* and *EF1* were used as house-keeping genes to normalize the expression levels of *cyp19a1b* mRNA. Melting curves and PCR efficiency analyses were performed to confirm correct amplification. Each experiment was performed at least three times. Results were expressed according to the comparative Ct method (ΔΔCt) for relative quantification of gene expression (Schmittgen and Livak, 2008). For each sample, the difference (ΔCt) was calculated between Ct values obtained for target and reference amplicons. Comparative ΔΔCt was next determined using as reference the ΔCT calculated for the vehicle control sample (EtOH), and absolute values for comparative expression level were determined as equal to $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Plasmids

Expression vectors encoding zfERα, zfERβ1 and zfERβ2 were previously described (Menuet *et al*., 2002), as were the CMV-β-gal plasmid (Merot *et al*., 2004), plasmid encoding human AR and MMTV-Luc (Lethimonier *et al*., 2000). In order to evaluate the transcriptional regulation of the *cyp19a1b* gene *in vitro*, we used a luciferase reporter gene placed under the control of 3kb of the proximal promoter of the *cyp19a1b* gene. This promoter contains a

functional ERE and potential AREs (Le Page *et al*., 2008; Le Page *et al*., 2006; Menuet *et al*., 2005).

Cell culture and transfection experiments

Human astrocyte U-251 MG cells were maintained at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldricht, St-Louis, USA) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS, Biowest), 2mM L-glutamine (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 20U/mL penicillin, 20µg/mL streptomycin and 50ng/mL amphotericin (Gibco). One day prior to transfection, U-251 MG cells were washed and seeded in fresh medium in 24 well plates at a density of 0.2 10^5 cells/mL. After 24 hrs, the medium was replaced with fresh medium containing 2% charcoal/dextran-treated FCS and different steroids (10^{-6}M, 10^{-7}M and 10^{-8}M of E2, T, DHT, 11KT, βDiol) with and without 10^{-6}M or 10^{-8} M $ICI_{182,780}$ (antagonist of ERs, Fisher Bioblock, Illkirch, France). U-251 MG cells were transfected with plasmid DNA using Fugen6™ Reagent as indicated by the manufacturer (Roche, Germany). The DNA mixes contained 25ng of zfER expression vector, 150ng of the *cyp19a1b*-Luc construct and 50ng of internal β-galactosidase control vector (CMV-β-gal). The luciferase activities were assayed 48 hrs later using the luciferase assay system (Promega), and were normalized using the β-galactosidase activity to normalize for transfection efficiency. Each experiment was performed at least in triplicate.

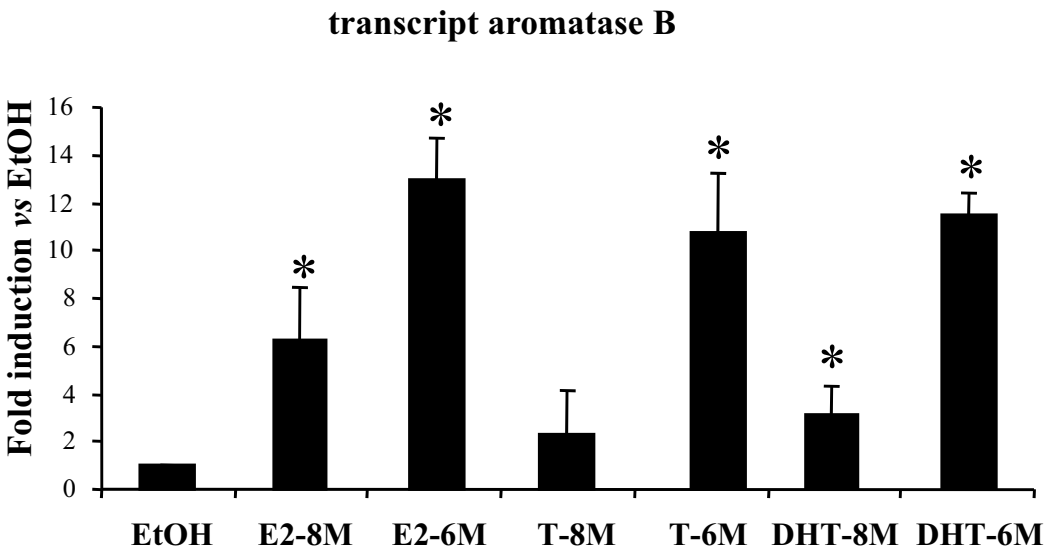


Figure 1: Estrogens and androgens stimulate the expression of aromatase B transcript in 72 dpf zebrafish larvae. At least 50 zebrafish larvae were exposed to ethanol (EtOH) or 10^{-8} or 10^{-6}M estradiol (E2), testosterone (T) or dihydrotestosterone (DHT). Total RNA were prepared from pooled animals, and the amounts of aromatase B mRNA were measured by real time quantitative RT-PCR. The results of these experiments are expressed as fold induction *vs*. values obtained in control populations (EtOH). The data presented are mean ± SD of values obtained in three independent exposure experiments performed in duplicates. Asterisks indicate a significant (Student t test) difference between treated and non treated populations ($P < 0.05$).

RESULTS

Aromatase B transcripts are up-regulated by testosterone and dihydrotestosterone in zebrafish larvae

While looking at the effects of T and DHT on aromatase B mRNA levels by real-time quantitative RT-PCR experiments, we observed that T and surprisingly DHT, used as a negative control, both caused an increase in *cyp19a1b* expression, in contrast with previous report in the goldfish (Gelinas *et al*., 1998). As expected (Menuet *et al*., 2005) and shown within **Figure 1**, E2 robustly stimulates the expression of aromatase B mRNA, whilst the expression of *GAPDH* and *EF1*, which are house-keeping genes used as internal controls, remain unchanged. This stimulation reaches 13 fold control (EtOH) values for a concentration of 10^{-6}M E2, and about 6 fold when E2 is used at 10^{-8}M. Importantly, when used at a concentration of 10^{-6}M, the fold induction of aromatase B mRNA by T and DHT is of a similar magnitude than E2 10^{-6}M (11 to 13 fold induction *vs*. control). This observation was confirmed by statistic analysis. However, at lower concentration (10^{-8}M), DHT is less potent than E2 and T only has low effect.

Aromatase B expression is up-regulated by testosterone and dihydrotestosterone only in the radial glial cells of zebrafish larvae

In order to confirm that this up-regulation of aromatase B expression by androgens was also observed at the protein level, and to identify the sites of aromatase B expression, we then used immunohistochemistry. To this purpose, zebrafish eggs were treated immediately after laying, and treated for 72hrs with hormones. Following incubation with an affinity purified antibody directed against zebrafish aromatase B (Menuet *et al*., 2005), our results show that E2-treated larvae, used as a positive control in these experiments, exhibit a very strong expression of aromatase B in the radial glial cells in the telencephalon, preoptic area and hypothalamus

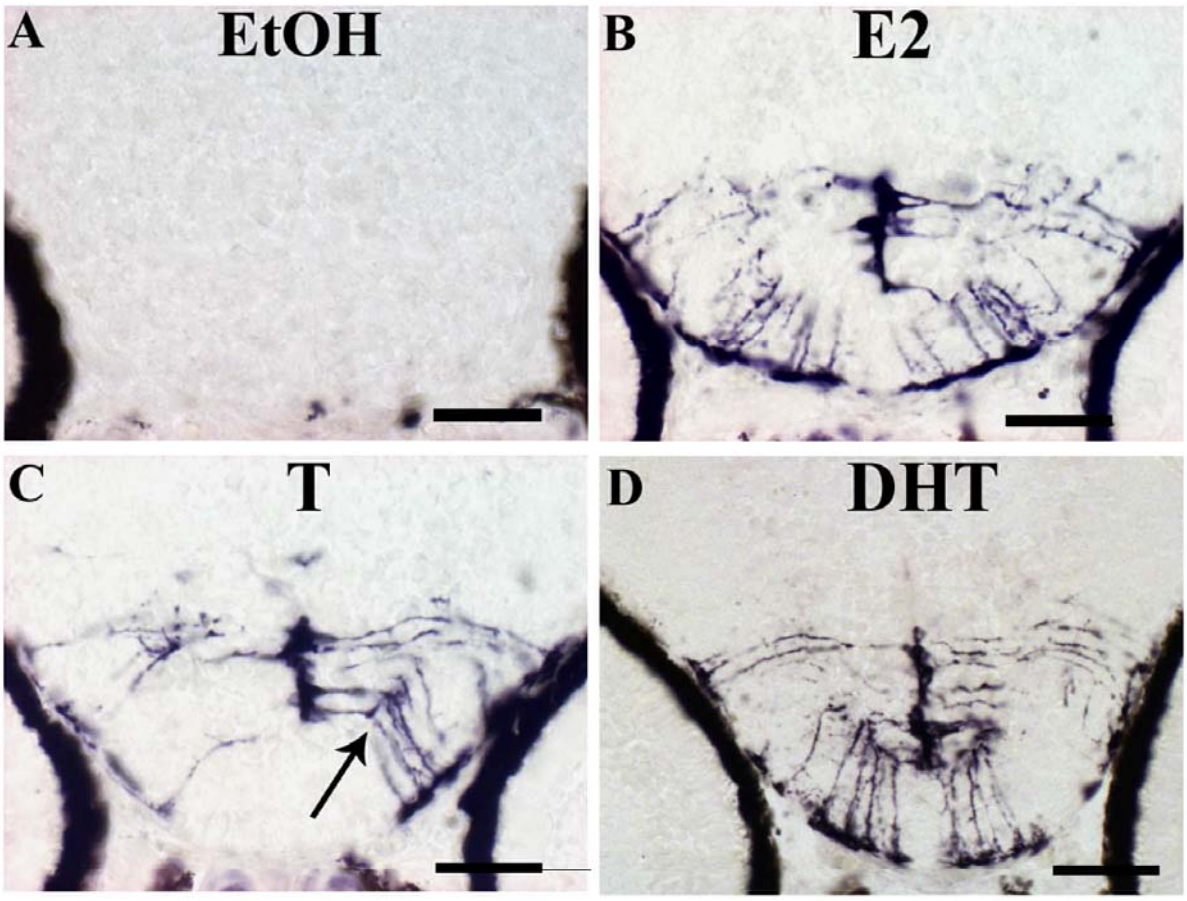


Figure 2: Immunohistochemical detection of aromatase B on transverse sections of the forebrain zebrafish at 72 hours post fertilization (hpf). Transverse section at the level of the preoptic area showing that following exposure to EtOH, no aromatase B-immunoreactive signal is observed (A), whereas treatment with 10^{-6}M E2 (B) or 10^{-6}M T (C) and 10^{-6}M of DHT (D) causes the appearance of aromatase B-positive cells along the midline of the preoptic region. In each case, the aromatase B-immunoreactive cells exhibit long lateral extensions (arrow). Scale bar = 25 μm.

(**Figure 2A** and **2B**), as previously shown (Menuet *et al*., 2005). In contrast, the control, EtOH treated, zebrafish larvae, display no significant signal (**Figure 2A** and **2B**). Interestingly, larvae treated with 10^{-6}M T or 10^{-7}M T also present a strong expression of aromatase B in the radial glial cells of the above-mentioned regions. The most anterior region is the telencephalon, in which aromatase B positive cells are found on the midline along the ventricle. An intense staining is also observed more posteriorly, in the preoptic area, where aromatase B is expressed medially. Importantly, a very strong staining is also detected in cytoplasmic processes and end feet, which is in accordance with the morphology of radial glial cells (**Figure 2C**). Positive cells were also detected in the caudal hypothalamus as two symmetrical cell populations positioned laterally around the lateral and posterior recesses. In this region, the signal observed was also very strong. A weaker labeling is observed when zebrafish larvae are treated with 10^{-8}M T (data not shown). Indeed, only a few labeled cells were observed in the telencephalon, in the midline along the ventricle and in the preoptic area. At this concentration of hormone, the strongest signal is observed in the lateral and posterior recesses of the hypothalamus, in the two symmetrical cell population positioned laterally (data not shown).

Interestingly, the pattern of labeling observed when larvae are treated with 10^{-6}M DHT, which is a non aromatizable androgen, is similar to what is observed with T (10^{-6}M). For instance, many cells are labeled in the midline along the telencephalon ventricle, as are glial cells in the preoptic area and hypothalamus, and, more caudally, cells located in the lateral recesses of the hypothalamus (**Figure 2D**). As observed when lowering the concentration of T, less immune-positive cells are observed in the telencephalon and the preoptic area of larvae treated with a concentration of 10^{-8}M DHT. However, at this dose of hormone, more aromatase B-positive cells were observed in the hypothalamus (data not shown). Importantly, the pattern of distribution of aromatase B observed with larvae treated

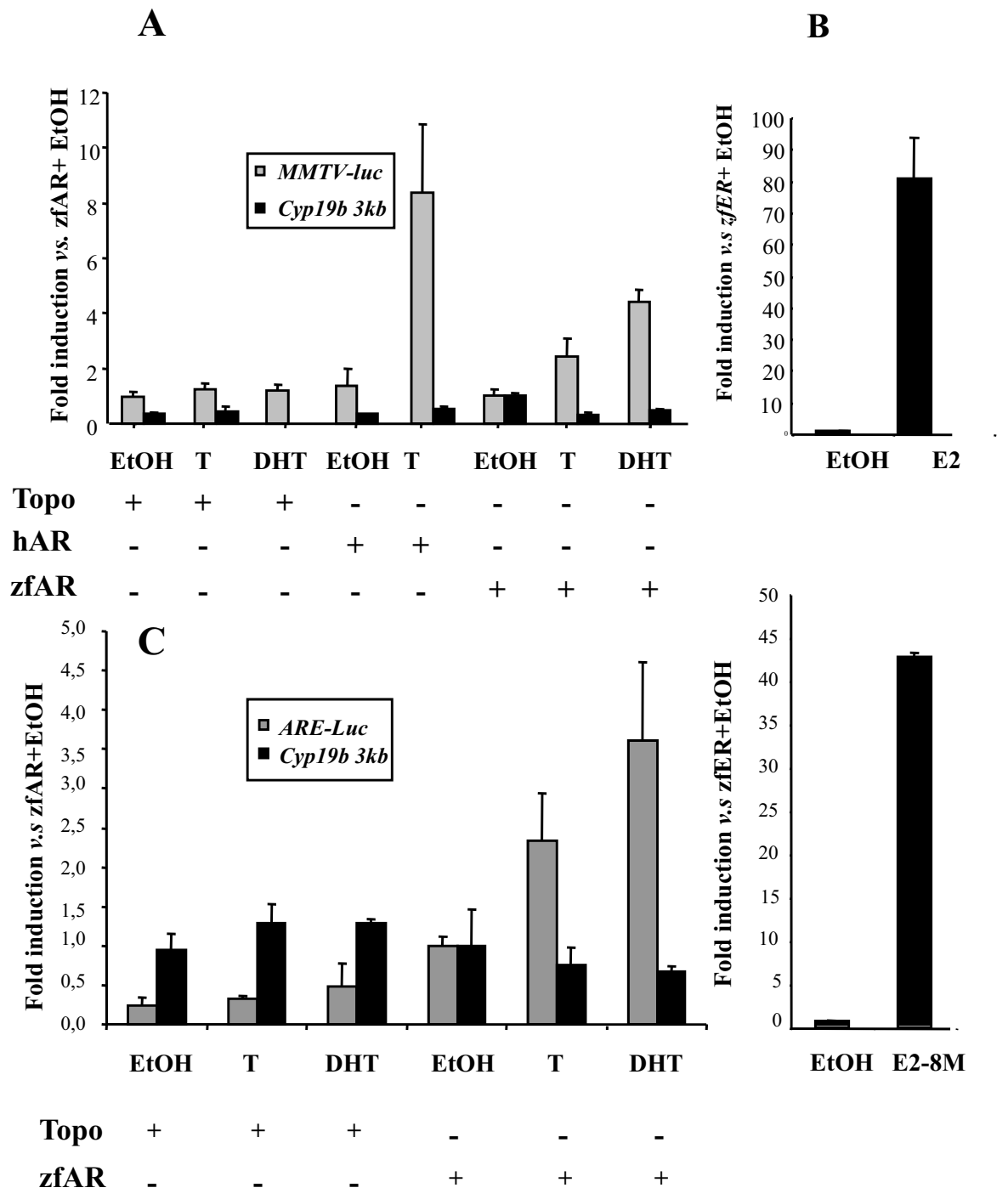


Figure 3: Regulation of MMTV and *cyp19a1b* reporter genes by androgens in the U-251 MG glial cell line. (A) U-251 MG cells were transfected with empty vector (Topo) or expression vectors encoding zebrafish (zfAR) or human androgen receptor (hAR), together with MMTV-Luc or *cyp19a1b*-Luciferase reporter genes and CMV β-Gal internal control. Following a 48h treatment with androgens (testosterone, T or dihydrotestostérone, DHT) at 10^{-6}M, luciferase activities were measured and normalized to β-galactosidase. The data shown, expressed as fold induction relative to control (Topo + EtOH) are mean ± SD of values obtained in 3 experiments performed in triplicates. (B) U-251 MG cells were transfected with a vector encoding zfERα together with the *cyp19a1b* and CMV β-Gal reporter genes, and treated for 48h with estradiol (E2). Results of experiments performed as in A are expressed as fold induction by E2 of the activity of the *cyp19a1b* reporter in the presence of zfERα. Data are mean ± SD of values obtained in 2 experiments performed in triplicates.

with T and DHT is highly similar to what is observed in E2 treated larvae, suggesting common underlying mechanisms.

In vitro, zfAR does not mediate a transcriptional stimulation of aromatase B gene by T and DHT

To study the mechanisms of aromatase B regulation by androgens, we performed *in vitro* transfection studies in the glial U-251 MG cell line, using a luciferase reporter gene placed under the control of the promoter of aromatase B (*cyp19a1b* 3kb-Luc). This promoter contains a functional ERE, a ½ ERE and a potential ARE. U251-MG cells were co-transfected with expression vector encoding zebrafish androgen receptor (zfAR) (de Waal *et al*., 2008a) or human AR (hAR), together with the *cyp19a1b* 3kb-Luc or the *MMTV*- Luc (an androgen responsive gene used as a positive control) reporter genes. As expected, the activity of the *MMTV*-Luc reporter gene is induced by T in the presence of hAR. Similarly, T and DHT induce the activity of this reporter gene in the presence of zfAR, by 3 or 5 fold, respectively (**Figure 3A**). In contrast, neither zfAR nor hAR are able to induce the transcription of the *cyp19a1b* 3kb-Luc reporter gene (**Figure 3A**) in the presence of 10^{-6}M T or DHT. Importantly, we verified that the *cyp19a1b* 3kb-Luc reporter gene was functional in our cell model, as shown by its strong stimulation (about 80 fold) by 10^{-8}M E2 when co-transfected with a plasmid encoding zfER (**Figure 3B**). As another control, we performed the same experiment using an ARE-TK-Luciferase reporter gene. As expected, this reporter gene was induced by T and DHT in the presence of zfAR, by 2.5 or 3.5 fold respectively (**Figure 3C**). These results therefore indicate that zfAR is unlikely to be involved in the transcriptional response of aromatase B by androgens.

The transcriptional stimulation of aromatase B gene by T and DHT is mediated by zfERs

We next tested whether the androgenic regulation of the *cyp19a1b* gene could be mediated by zfER. We thus co-transfected U251-MG cells with the *cyp19a1b* 3kb-Luc reporter gene and

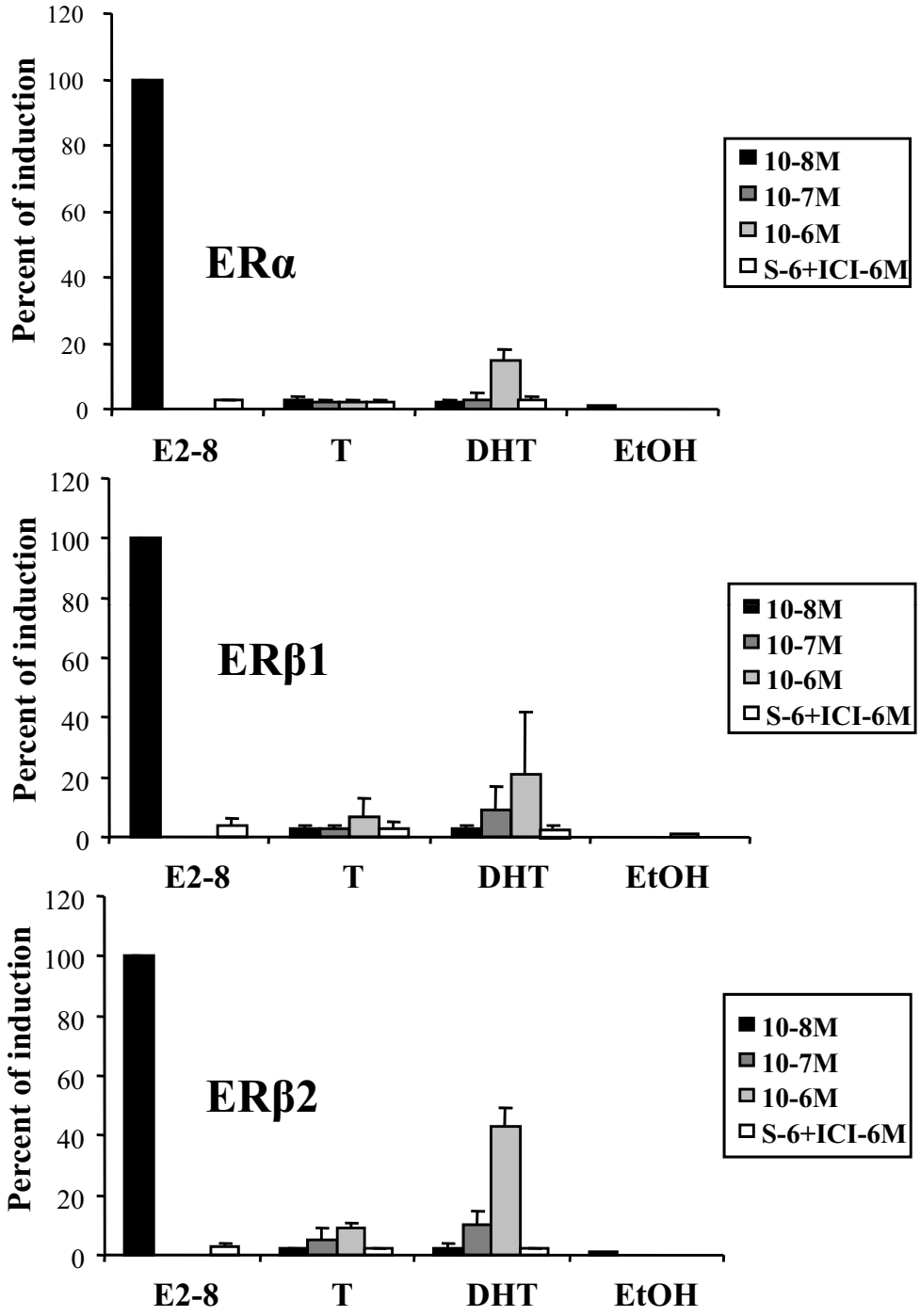


Figure 4: Evaluation of the transcriptional activation of the *cyp19a1b* 3kb-Luc reporter gene by zfERs in the presence of estrogens and androgens. U-251 MG glial cells were transfected with the *cyp19a1b* and CMV β-Gal reporter genes and expression vector for zfERα (A), zfERβ1 (B), or zfERβ2 (C). Cells were treated with different steroids (estradiol, E2; testosterone, T; dihydrotesosterone, DHT), at 10^{-8}M, 10^{-7}M or 10^{-6}M. U-251 MG cells were also co-treated with the highest concentration of these steroids and 10^{-6}M of $ICI_{182,780}$, which is an ER antagonist. β-Galactosidase normalized data were expressed relative to the induction measured in the presence of 10^{-8}M E2 (100%). Values shown are mean ± SD of data acquired in three independent experiments performed in triplicates.

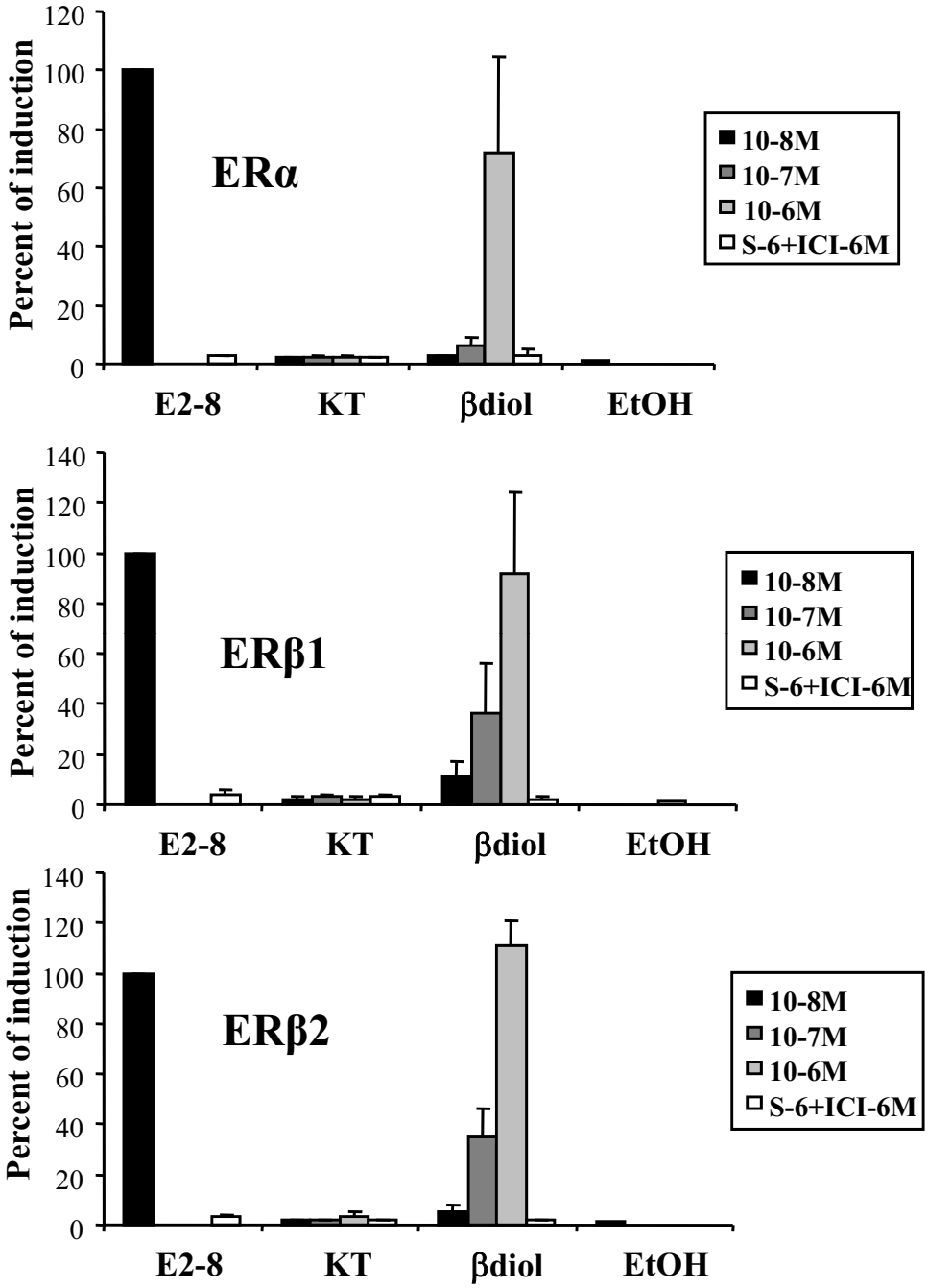


Figure 5: Evaluation of the transcriptional activation of the *cyp19a1b* 3kb-Luc reporter gene by zfER in the presence of estrogens and androgens. U-251 MG glial cells were transfected with the *cyp19a1b* and CMV β-Gal reporter genes and expression vector for zfERα (A), zfERβ1 (B), or zfERβ2 (C). Cells were treated with a non aromatizable androgen, 11-ketotestosterone, 11-KT or a metabolite of DHT, βdiol, at 10^{-8}M, 10^{-7}M or 10^{-6}M. U-251 MG cells were also co-treated with the highest concentration of these steroids and 10^{-6}M of $ICI_{182,780}$, which is an ER antagonist. β-Galactosidase normalized data were expressed relative to the induction measured in the presence of 10^{-8}M E2 (100%). Values shown are mean ± SD of data acquired in three independent experiments performed in triplicates.

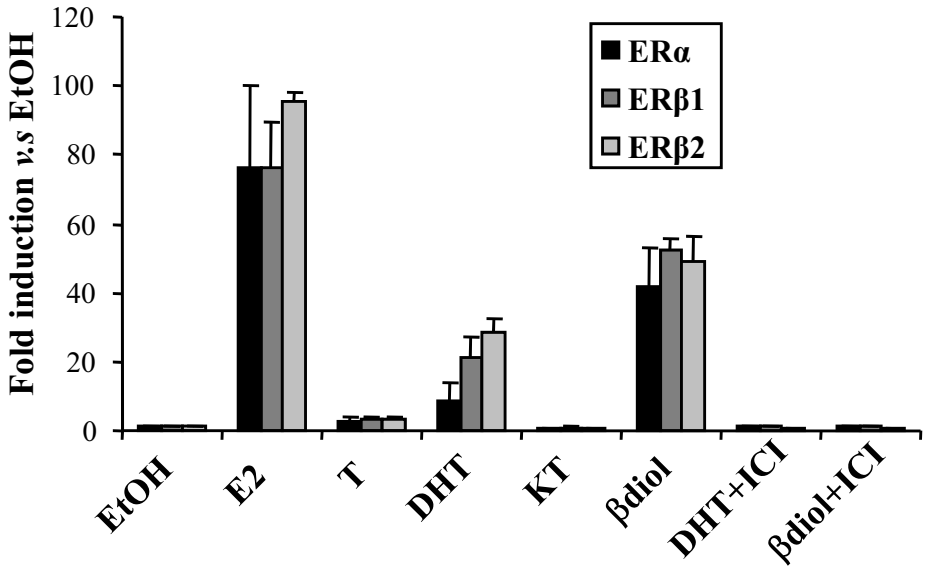


Figure 6: Direct comparison of the activity of zfERα, zfERβ1 and zfERβ2 on the *cyp19a1b* 3kb-Luc reporter gene in the presence of estrogens and androgens. U-251 MG glial cells were transfected with the *cyp19a1b* and CMV β-Gal reporter genes and expression vector for zfERα (A), zfERβ1 (B), or zfERβ2 (C). Cells were treated with different steroids(estradiol, E2; testosterone, T; dihydrotestosterone, DHT; 11-ketotestosterone, 11-KT and βdiol), at 10^{-6}M. U-251 MG cells were also co-treated with 10^{-6}M of DHT or βdiol and $ICI_{182,780}$, which is an ER antagonist. β-Galactosidase normalized data were expressed relative to the induction measured in the presence of 10^{-8}M E2 (100%). Values shown are mean ± SD of data obtained from three independent experiments performed in triplicates.

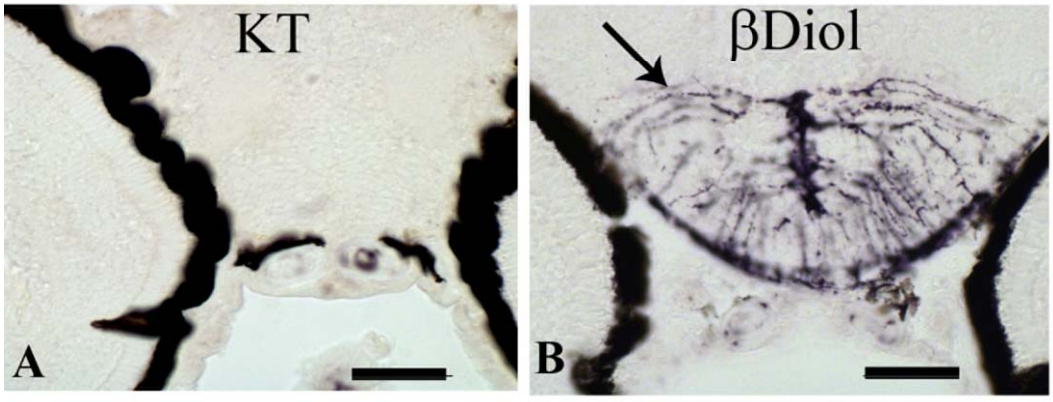


Figure 7: Immunohistochemical detection of aromatase B on transverse sections of the forebrain zebrafish at 72 hours post fertilization (hpf). Transverse sections at the level of the preoptic area showing that following exposure to 11-KT, no aromatase B-immunoreactive signal is observed (A). Following a treatment with 10^{-6}M βdiol (B) a strong expression of aromatase B is observed in radial glial cells along the midline of the preoptic region. The AroB-immunoreactive cells exhibit long lateral extensions with end feet at the brain surface (arrow). Scale bar= 25µm.

plasmids encoding each zfER subtype (ERα, ERβ1 and ERβ2). Cells were treated with T or DHT in presence or absence of the ER antagonist $ICI_{182,780}$. As shown within **Figure 4**, in the presence of all zfER, the transcriptional activity of the reporter gene was induced by T and DHT, in a dose-dependent manner, with a maximum activity of 10 % or 40% of the response obtained with 10^{-8}M E2, respectively. However, interestingly, $ICI_{182,780}$ completely abolishes the induction of the *cyp19a1b*-Luc reporter gene response to T and DHT (**Figure 4**). Altogether, these results demonstrate that, *in vitro*, zfERs but not zfAR are able to transduce a transcriptional response of the promoter of the c*yp19a1b* gene in the presence of T and DHT.

Consequently, we next tested another non aromatizable androgen, 11-KT, and βdiol, a metabolite of DHT known for its estrogenicity. In contrast to T and DHT, the non aromatizable androgen KT completely fails to induce the activity of the *cyp19a1b*-Luc reporter gene (**Figure 5**). However, most interestingly, βdiol strongly induces the reporter gene to a similar extent than E2, and this stimulation was inhibited by a co-treatment with $ICI_{182,780}$ (**Figure 5**). In mammals, it has been shown that βdiol effects are preferentially mediated by ERβ (Handa *et al*., 2008). We next sought to test whether such a preference also exist in the case of the zfERs. We therefore directly compared the transcriptional activity of the zfER forms upon treatment with the different steroids. The results of these experiments, illustrated within **Figure 6**, indicate that, although zfERβ1 and zfERβ2 tend to exhibit a higher activity upon βdiol treatment, no significant differences exist.

In vivo, aromatase B expression is up-regulated by βdiol in the radial glial cells of zebrafish larvae but not by 11-KT, another non aromatizable androgen

In order to confirm the results obtained *in vitro*, the effects of 11-KT and βdiol on the expression of aromatase B were next evaluated *in vivo*. Larvae treated with the non aromatizable androgen 11-KT do not show any aromatase B-positive cells, in any regions previously described (**Figure 2**), using either 10^{-8}M (data not shown) or 10^{-6}M 11-KT (**Figure**

7,A). This confirms the absence of effect of 11-KT already observed *in vitro*. In contrast, confirming the strong *in vitro* induction of the *cyp19a1b* 3kb-luc reporter gene by βdiol, numerous aromatase B-positive cells (**Figure 7B**) were observed in the larvae treated with βdiol (10^{-6}M). As shown within **Figure 7**, a strong signal was observed in the radial glial cells lining the ventricle in the telencephalon. As observed following E2 and DHT treatments, numerous cells were labeled in the preoptic area, perfectly showing the typical morphology of radial glial cells (**Figure 7B**). At a lower concentration of βdiol, only a few positive cells were observed, and only in the lateral and posterior recesses of the hypothalamus (data not shown).

DISCUSSION

The mechanisms of aromatase expression in the brain of vertebrates are still poorly understood and remain controversial. However, there is a general agreement that sex steroids, either androgens, estrogens, or a combination of both (Roselli and Resko, 1993; Zhao *et al*., 2007) influence the transcriptional activity of the aromatase gene. In teleosts, it is clear that estrogens positively upregulate aromatase B expression, an effect that involves estrogen receptors, an ERE sequence localized within the proximal promoter of the *cyp19a1b* gene (Le Page *et al*., 2008; Le Page *et al*., 2006; Menuet *et al*., 2005) and that requires a neuroglial context, in agreement with the fact that aromatase B is only expressed in radial glial cells in the brain of teleosts (Menuet *et al*., 2005; Pellegrini *et al*., 2005). Additionally, some data indicate that androgen treatment or high levels of circulating androgens stimulate aromatase activity or aromatase expression in fish (Gelinas *et al*., 1998; Gonzalez and Piferrer, 2003; Mayer *et al*., 1991). Interestingly, the presence of ARE-like response elements on the *cyp19a1b* promoter also raised the possibility that androgens may have a direct transcriptional effect. However, to date, no one has ever looked in details at the potential effects of androgens on aromatase B expression in fish. We thus aimed at determining whether these androgen

effects were direct or due to brain aromatization translating androgenic effects into estrogenic ones.

In this study, aromatase B protein and transcripts were indeed found to be up-regulated by T, thereby confirming previous Northern Blot data obtained following treatment of zebrafish larvae with T (Gelinas *et al*., 1998). Importantly, aromatase B was found to be highly expressed in response to hormonal treatments only in radial glial cells, further illustrating the known requirement of a neuroglial context for the regulation of the *cyp19a1b* gene (Le Page *et al*., 2008; Le Page *et al*., 2006; Menuet *et al*., 2005). Furthermore, these results confirm that the strong regulation of aromatase B by T occurs mainly in forebrain regions, such as the telencephalon, preoptic area, and hypothalamus as previously observed (Gelinas *et al*., 1998; Lassiter and Linney, 2007). To confirm these results suggesting that a local aromatization of T into E2 may occur, we then used DHT, a non aromatizable androgen. Surprisingly, and contrasting with results obtained by others in goldfish (Gelinas *et al*., 1998), DHT was also an efficient activator of aromatase B expression in zebrafish brain. This discrepancy might be explained by the higher sensitivity of the quantitative PCR method as compared to Northern blot. However, a very significant stimulation of the *cyp19a1b* gene expression in zebrafish brains, consecutive to an exposure to DHT, was also recently observed (Lassiter and Linney, 2007).

We then performed *in vitro* studies to precisely determine whether the effects exerted by T on *cyp19a1b* expression were direct, indirect, mediated by conversion into estrogens, or a combination of different signaling pathways. Importantly, the activity of the *cyp19a1b*-Luc reporter gene remained unchanged following co-transfection with plasmids expressing zfAR and treatment with T, DHT or 11-KT, despite the fact that these androgens are able to induce transactivation of a reporter gene placed under the control of AREs (de Waal *et al*., 2008b). These results indicate that zfAR is unlikely to be involved in the transcriptional response of

cyp19a1b upon treatment with androgens. This lack of effects is not due to a default in zfAR functionality as this receptor was able to induce transactivation of the ARE-TK-luciferase or that of MMTV-luciferase reporter genes. Thus, it is very likely that the putative half ARE sites present within the promoter sequence of the *cyp19a1b* gene are not able to recruit zfAR under these conditions. These data are reinforced by the fact that 11-KT is totally ineffective both *in vivo* and *in vitro* in stimulating *cyp19a1b* expression. In contrast, all zfER (ERα, ERβ1 and ERβ2) were able to induce the transcription of the *cyp19a1b*-Luc reporter gene in the presence of T and DHT. Importantly, 11-KT, that efficiently activates zfAR (de Waal *et al*., 2008b), was unable to induce any transcriptional activity in the presence of either zfER subtype, nor to stimulate aromatase B expression *in vivo*. This therefore suggests that, both *in vivo* and *in vitro*, T and DHT effects are mediated by ERs and not by ARs.

Confirming this latter possibility, there is evidence that astrocytoma, astroglioma-derived cell lines or astrocytes exhibit an aromatase activity *in vitro*, therefore offering an explanation for the estrogenic effects of T *in vitro* (Yague *et al*., 2004; Zwain and Yen, 1999; Zwain *et al*., 1997). On the other hand, there is no information concerning a possible 3β-hydroxysteroid dehydrogenase activity in astrocytes *in vitro*. This enzyme converts DHT in βdiol, a well-known estrogenic androgen derivative that strongly stimulates the transcriptional activity of mammalian ERs (Kuiper *et al*., 1998), and notably that of ERβ (Handa *et al*., 2008; Pak *et al*., 2005). Given this high affinity of ER for βdiol, we therefore postulate that DHT may indirectly regulate the *cyp19a1b* gene, through conversion into βdiol. This was verified *in vivo* by showing that βdiol *in vivo* induces a pattern of aromatase B expression in the radial glial cells similar to those observed following T, DHT, or E2 treatments. This implies that the brain of zebrafish has 3β-hydroxysteroid dehydrogenase activity similar to the mammalian brain (Handa *et al*., 2008; Pak *et al*., 2007). Furthermore, *in vitro*, βdiol induced the transcriptional activity of the *cyp19a1b*-Luc reporter gene in the presence of zfER, and in a

dose dependent manner. Finally, the complete abolition of the stimulatory effects exerted by E2, T, DHT and βdiol on *cyp19a1b*-Luc activity by $ICI_{182,780}$, strongly suggest that these regulations are directly mediated through zfER *in vitro*.

The fact that the brain of fish might be able to locally produce βdiol is a new finding that will require further investigations. This implies that caution must be taken when using DHT as a negative control indicating an absence of aromatization. Indeed, this 5α-reduced form of testosterone classically considered as an AR agonist with no ability to be aromatized to estrogen-like metabolites, does induce estrogenic effects after conversion into βdiol by 3β-hydroxysteroid dehydrogenase. Whether such enzymatic activity has any functional significance in the brain of fish remains open to speculation. In mammals, it was shown that βdiol could notably be involved in the modulation of stress, by acting on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis (Handa *et al*., 2008). Importantly, the effects of DHT and βdiol on stress are blocked by estrogen receptor antagonists such as the $ICI_{182,782}$ but not by flutamide, which is an androgen receptor antagonist (Handa *et al*., 2008).

In addition to the known regulation of the *cyp19a1b* gene by E2, we therefore demonstrate that other steroids can influence the transcription rate of this gene. These regulations, which can be direct or indirect through aromatization of T or conversion of DHT into βdiol, are likely to require zfERs. In mammals, βdiol has higher transactivation ability in the presence of ERβ than with ERα (Pak *et al*., 2005). As determined in this study, although zfERβ1 and zfERβ2 seem to exhibit a slightly higher activity than zfERα in the presence of βdiol, these differences are not significant. *In vivo*, even though the expression of ERα is not reported in radial glial cells of trout and zebrafish, its presence is correlated with the expression of aromatase B in certain brain regions, notably in areas such as the preoptic area and mediobasal hypothalamus (Menuet *et al*., 2003; Menuet *et al*., 2002). In contrast, there is indication that zfERβ messengers are expressed along the brain ventricles in many regions of

the zebrafish brain (F. Adrio and O. Kah, unpublished), although the real evidence that radial cells express ERβs is still lacking. It is also possible that, given the high E2-sensitivity of the *cyp19a1b* gene, low levels of ER, undetected by conventional techniques, are sufficient to induce the up-regulation of the *cyp19a1b* gene, as indicated by previous experiments performed on brain cell cultures enriched in glial cells (Menuet *et al*., 2003).

The regulation of the *cyp19a1b* gene by different steroids, estrogens and androgens, is likely to constitute a key process generating important amounts of aromatase B in radial glial cells of mature fish. The physiological significance of this strong expression is still unknown, but might be correlated to the fact that radial aromatase B-expressing radial glial cells are progenitor cells in the brain of zebrafish (Pellegrini *et al*., 2007). This suggests that E2 may, among other actions, modulate some cellular mechanisms involved in neurogenesis. Several studies in other vertebrates have indeed recently documented an expression of aromatase in radial cells. This is notably the case in birds following cortical lesions (Peterson *et al*., 2004) or during the embryonic development of the cortex in the mouse (Martinez-Cerdeno *et al*., 2006). Aromatase has also been shown to be up-regulated after chemical or mechanical lesions in the brain of birds and mammals, most likely in astrocytes (Garcia-Segura *et al*., 2003), suggesting a possible role for E2 in neurogenesis of brain repair (Mouriec *et al*., 2008). The mechanisms mediating aromatase expression in such situations are totally unknown, but it is not impossible that part of them resembles those reported in the present work.

ACKNOWLEGEMENTS

We thank Dr. J Bogerd (University of Utrecht) for the gift of the zebrafish androgen receptors expression vector. We wish to acknowledge the key role of the staff of the zebrafish facility (INRA-SCRIBE and IFR 140). We thank Raphaël Métivier and Christophe Nicolas Nicolaz for their valuable input and help with the statistical analysis. Thanks to Miranda Maybank for language improvement. This work was funded by the CNRS and the Ministry of Research and Technology and the Agence Nationale de la Recherche. Karen Mouriec is supported by the Ministry of Research and Technology.

REFERENCES

Balthazart, J., and Ball, G. F. (1998). New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). Trends Neurosci *21*, 243-249.

Behl, C. (2002). Estrogen can protect neurons: modes of action. J Steroid Biochem Mol Biol *83*, 195-197.

Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfray, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., and Eggen, R. I. (2007). Expression of zebra fish aromatase cyp19a and cyp19b genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. Toxicol Sci *96*, 255-267.

Chiang, E. F., Yan, Y. L., Tong, S. K., Hsiao, P. H., Guiguen, Y., Postlethwait, J., and Chung, B. C. (2001). Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes. J Exp Zool *290*, 709-714.

Conley, A., and Hinshelwood, M. (2001). Mammalian aromatases. Reproduction *121*, 685-695.

De Waal, P., Wang, D., Nijenhuis, W., Schulz, R., and Bogerd, J. (2008a). Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (Danio rerio) testis. Reproduction.

De Waal, P. P., Wang, D. S., Nijenhuis, W. A., Schulz, R. W., and Bogerd, J. (2008b). Functional characterization and expression analysis of the androgen receptor in zebrafish (Danio rerio) testis. Reproduction *136*, 225-234.

Forlano, P. M., Deitcher, D. L., Myers, D. A., and Bass, A. H. (2001). Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. J Neurosci *21*, 8943-8955.

Garcia-Segura, L. M., Naftolin, F., Hutchison, J. B., Azcoitia, I., and Chowen, J. A. (1999). Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. J Neurobiol *40*, 574-584.

Garcia-Segura, L. M., Veiga, S., Sierra, A., Melcangi, R. C., and Azcoitia, I. (2003). Aromatase: a neuroprotective enzyme. Prog Neurobiol *71*, 31-41.

Gelinas, D., Pitoc, G. A., and Callard, G. V. (1998). Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. Mol Cell Endocrinol *138*, 81-93.

Gonzalez, A., and Piferrer, F. (2003). Aromatase activity in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. Gen Comp Endocrinol *132*, 223-230.

Gotz, M., Hartfuss, E., and Malatesta, P. (2002). Radial glial cells as neuronal precursors: a new perspective on the correlation of morphology and lineage restriction in the developing cerebral cortex of mice. Brain Res Bull *57*, 777-788.

Handa, R. J., Pak, T. R., Kudwa, A. E., Lund, T. D., and Hinds, L. (2008). An alternate pathway for androgen regulation of brain function: activation of estrogen receptor beta by the metabolite of dihydrotestosterone, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol. Horm Behav *53*, 741-752.

Hawkins, M. B., Thornton, J. W., Crews, D., Skipper, J. K., Dotte, A., and Thomas, P. (2000). Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 10751-10756.

Kishida, M., and Callard, G. V. (2001). Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (Danio rerio) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. Endocrinology *142*, 740-750.

Kuiper, G. G., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., and Gustafsson, J. A. (1998). The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. Front Neuroendocrinol *19*, 253-286.

Kwon, J. Y., McAndrew, B. J., and Penman, D. J. (2001). Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia Oreochromis niloticus. Mol Reprod Dev *59*, 359-370.

Lassiter, C. S., and Linney, E. (2007). Embryonic expression and steroid regulation of brain aromatase cyp19a1b in zebrafish (Danio rerio). Zebrafish *4*, 49-57.

Le Page, Y., Menuet, A., Kah, O., and Pakdel, F. (2008). Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. Mol Reprod Dev.

Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., and Pakdel, F. (2006). Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. Environ Health Perspect *114*, 752-758.

Lephart, E. D. (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. Brain Res Brain Res Rev *22*, 1-26.

Lethimonier, C., Flouriot, G., Valotaire, Y., Kah, O., and Ducouret, B. (2000). Transcriptional interference between glucocorticoid receptor and estradiol receptor mediates the inhibitory effect of cortisol on fish vitellogenesis. Biol Reprod *62*, 1763-1771.

Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S. C., and Kriegstein, A. R. (2006). Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. Eur J Neurosci *24*, 3475-3488.

Mayer, I., Borg, B., Berglund, I., and Lambert, J. G. (1991). Effects of castration and androgen treatment on aromatase activity in the brain of mature male Atlantic salmon (Salmo salar L.) parr. Gen Comp Endocrinol *82*, 86-92.

McCarthy, M. M., Amateau, S. K., and Mong, J. A. (2002). Steroid modulation of astrocytes in the neonatal brain: implications for adult reproductive function. Biol Reprod *67*, 691-698.

Menuet, A., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F., and Kah, O. (2003). Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. J Comp Neurol *462*, 180-193.

Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., and Pakdel, F. (2002). Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. Biol Reprod *66*, 1881-1892.

Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M. M., Anglade, I., Pakdel, F., and Kah, O. (2005). Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. J Comp Neurol *485*, 304-320.

Merot, Y., Metivier, R., Penot, G., Manu, D., Saligaut, C., Gannon, F., Pakdel, F., Kah, O., and Flouriot, G. (2004). The relative contribution exerted by AF-1 and AF-2 transactivation functions in estrogen receptor alpha transcriptional activity depends upon the differentiation stage of the cell. J Biol Chem *279*, 26184-26191.

Mouriec, K., Pellegrini, E., Anglade, I., Menuet, A., Adrio, F., Thieulant, M. L., Pakdel, F., and Kah, O. (2008). Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis? Brain Res Bull *75*, 274-280.

Naftolin, F. (1994). Brain aromatization of androgens. J Reprod Med *39*, 257-261.

Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Wong, W. S., Clinton, B. K., and Kriegstein, A. R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci *22*, 3161-3173.

Pak, T. R., Chung, W. C., Hinds, L. R., and Handa, R. J. (2007). Estrogen receptor-beta mediates dihydrotestosterone-induced stimulation of the arginine vasopressin promoter in neuronal cells. Endocrinology *148*, 3371-3382.

Pak, T. R., Chung, W. C., Lund, T. D., Hinds, L. R., Clay, C. M., and Handa, R. J. (2005). The androgen metabolite, 5alpha-androstane-3beta, 17beta-diol, is a potent modulator of estrogen receptor-beta1-mediated gene transcription in neuronal cells. Endocrinology *146*, 147-155.

Pasmanik, M., and Callard, G. V. (1985). Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. Gen Comp Endocrinol *60*, 244-251.

Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M. M., Tascon, C., Anglade, I., Pakdel, F., and Kah, O. (2005). Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. Gen Comp Endocrinol *142*, 60-66.

Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M. M., Marmignon, M. H., Brion, F., Pakdel, F., and Kah, O. (2007). Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. J Comp Neurol *501*, 150-167.

Peterson, R. S., Fernando, G., Day, L., Allen, T. A., Chapleau, J. D., Menjivar, J., Schlinger, B. A., and Lee, D. W. (2007). Aromatase expression and cell proliferation following injury of the adult zebra finch hippocampus. Dev Neurobiol *67*, 1867-1878.

Peterson, R. S., Lee, D. W., Fernando, G., and Schlinger, B. A. (2004). Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. J Comp Neurol *475*, 261-269.

Rakic, P. (1978). Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon. Postgrad Med J *54 Suppl 1*, 25-40.

Roselli, C. E., and Resko, J. A. (1993). Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences. J Steroid Biochem Mol Biol *44*, 499-508.

Roselli, C. F. (2007). Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection. J Steroid Biochem Mol Biol *106*, 143-150.

Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc *3*, 1101-1108.

Shu, S. Y., Ju, G., and Fan, L. Z. (1988). The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. Neurosci Lett *85*, 169-171.

Steinke, D., Hoegg, S., Brinkmann, H., and Meyer, A. (2006). Three rounds (1R/2R/3R) of genome duplications and the evolution of the glycolytic pathway in vertebrates. BMC Biol *4*, 16.

Tchoudakova, A., Kishida, M., Wood, E., and Callard, G. V. (2001). Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. J Steroid Biochem Mol Biol *78*, 427-439.

Tong, S. K., and Chung, B. C. (2003). Analysis of zebrafish cyp19 promoters. J Steroid Biochem Mol Biol *86*, 381-386.

Trant, J. M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B. C., and Place, A. R. (2001). Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (Danio rerio). J Exp Zool *290*, 475-483.

Yague, J. G., Lavaque, E., Carretero, J., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M. (2004). Aromatase, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, is expressed by human and rat glioblastomas. Neurosci Lett *368*, 279-284.

Zhao, C., Fujinaga, R., Tanaka, M., Yanai, A., Nakahama, K., and Shinoda, K. (2007). Region-specific expression and sex-steroidal regulation on aromatase and its mRNA in the male rat brain: immunohistochemical and *in situ* hybridization analyses. J Comp Neurol *500*, 557-573.

Zwain, I. H., and Yen, S. S. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. Endocrinology *140*, 3843-3852.

Zwain, I. H., Yen, S. S., and Cheng, C. Y. (1997). Astrocytes cultured *in vitro* produce estradiol-17beta and express aromatase cytochrome P-450 (P-450 AROM) mRNA. Biochim Biophys Acta *1334*, 338-348.

Discussion générale et perspectives

DISCUSSION GENERALE

ET

PERSPECTIVES

Les travaux réalisés durant cette thèse ont eu pour but, d'une part, d'étudier le rôle des cellules gliales radiaires exprimant l'aromatase B dans la neurogenèse adulte du poisson zèbre, d'autre part, d'approfondir l'étude des relations entre l'aromatase, les récepteurs aux œstrogènes (zfERs) et les stéroïdes sexuels. Plusieurs informations marquantes sont ainsi issues de ces études.

Nos travaux ont montré, pour la première fois, que les cellules gliales radiaires aromatase B-positives sont des cellules progénitrices dans le cerveau adulte de poisson zèbre. En effet, nous montrons que :

- L'aromatase B est exprimée exclusivement dans les cellules gliales radiaires et jamais dans les neurones.

- Dans le cerveau antérieur, les cellules qui se divisent sont toujours positionnées en bordure de ventricule.

- Les cellules gliales radiaires se divisent pour générer de nouvelles cellules, qui vont migrer le long des prolongements radiaires et se différencier en neurones.

La caractérisation d'une lignée de poisson zèbre transgénique aromatase B/GFP a permis:

- De confirmer les données sur la localisation et la régulation œstrogénique de l'aromatase B connues chez les animaux sauvages. Ceci valide l'intérêt de cette lignée de poisson zèbre transgénique aromatase B/GFP pour l'étude des processus de neurogenèse *in vivo* et du rôle potentiel de l'E2 dans ces processus.

Des expériences réalisées à différents stades de développement embryonnaire chez le poisson zèbre ont permis :

- De montrer que les messagers aromatase B et ceux des trois sous-types de zfERs (zfERα, zfERβ1 et zfERβ2), détectés par RT-PCR en temps réel, apparaissent tôt pendant le développement du poisson zèbre et augmentent significativement entre 24h et 48h.

- De démontrer, *via* l'utilisation d'un antagoniste des ERs, que l'expression précoce (entre 24h et 48h) de l'aromatase B pendant le développement est soumise à une régulation

œstrogénique impliquant les ERs et de suggérer que les zfERβs seraient responsables de cette régulation. En effet, les expériences d'hybridation *in toto* ont montré que zfERβ1 et zfERβ2 apparaissent dès 36h dans le cerveau antérieur alors que les messagers ERα ne sont détectables dans le cerveau qu'à partir de 15 jours. Par conséquent, les messagers zfERα détectés par RT-PCR en temps réel correspondent aux messagers détectés dans le foie par hybridation *in toto.*

L'analyse approfondie, *in vivo* et *in vitro*, des mécanismes de régulation du gène codant l'aromatase B par l'E2 a permis de mettre en évidence :

- Une régulation du gène *cyp19a1b* par des androgènes aromatisables comme la T, mais également par des androgènes non aromatisables comme la dihydrotestostérone (DHT).

- Que cette régulation androgénique du gène *cyp19a1b* n'implique pas une transactivation du gène *via* les ARs.

- Que cette régulation androgénique est indirecte, impliquant les ERs, très probablement *via* une aromatisation de la T en E2 et une métabolisation de la DHT en βdiol, un androgène à activité œstrogénique.

I- Les cellules gliales radiaires sont des cellules progénitrices dans le cerveau adulte de poisson zèbre.

Nous avons montré que les cellules gliales radiaires aromatase B-positives sont des cellules progénitrices neuronales dans le cerveau adulte de poisson zèbre. Cette découverte est particulièrement intéressante dans la mesure où malgré l'existence d'une forte activité neurogénique dans tout le cerveau et d'une capacité importante de régénération, il existe très peu d'informations concernant la neurogenèse adulte chez les poissons (Caton *et al*., 1980; Kranz and Richter, 1975; Zupanc, 2006). Ce rôle des cellules gliales radiaires en tant que cellules progénitrices neuronales chez l'adulte n'est finalement pas inattendu puisque ces cellules gliales radiaires sont connues pour être des cellules progénitrices neuronales chez les mammifères pendant la neurogenèse embryonnaire (Noctor *et al*., 2002).

Bien que de nombreuses inconnues demeurent quant au détail des mécanismes sous-jacents, nous avons ainsi observé et décrit dans le cerveau adulte de poisson zèbre des processus de neurogenèse qui sont en partie similaires à ceux observés chez la souris pendant le développement : ces cellules positionnées en bordure de ventricule se divisent pour générer

de nouvelles cellules qui vont migrer le long des prolongements radiaires puis se différencier en neurones et coloniser leur territoire final (*cf.* **Résultats chapitre I/1** et Noctor *et al*., 2002). Ces résultats sont en accord avec ceux d'une autre étude basée sur l'utilisation de la BLBP comme marqueur des cellules gliales radiaires (Adolf *et al*., 2006). Suite à ces observations de nombreuses questions peuvent se poser.

I-1 Division symétrique ou asymétrique ?

Tout d'abord, les cellules gliales radiaires se divisent-elles de manière asymétrique comme chez les mammifères ? Cette question est importante dans la mesure où le type de division détermine la destinée des cellules filles (Huttner and Kosodo, 2005) et est donc abordée dans un nombre croissant d'études. Des travaux ont ainsi montré que, dans l'intestin, lorsqu'une cellule se divise de manière asymétrique après avoir subi un traitement à la BrdU, seules les cellules filles « héritent » de la BrdU (Potten *et al*., 2002). Ces données ont ensuite été confirmées dans des cellules progénitrices du cerveau de rongeurs et de primates lors du développement (Huttner and Kosodo, 2005). Néanmoins, l'hypothèse de la ségrégation de l'ADN est très controversée (Lansdorp, 2007). Dans le cadre de notre étude, certaines données permettent d'avancer quelques hypothèses sur le mode de division des cellules gliales radiaires chez le poisson zèbre. En effet, plusieurs jours après le traitement à la BrdU, des cellules BrdU positives ont été observées dans le parenchyme cérébral, ces cellules correspondant aux cellules filles se différenciant en neurones. Cependant, des cellules BrdU-positives sont également observées en bordure de ventricules et expriment l'aromatase B, les définissant donc comme des cellules gliales radiaires. Dans la mesure où un processus de division asymétrique avec ségrégation de l'ADN ne devrait permettre qu'aux cellules filles de contenir de la BrdU (Potten *et al*., 2002), ces résultats semblent donc indiquer que les cellules gliales radiaires n'utilisent pas, ou pas uniquement, un processus de division asymétrique pour générer de nouvelles cellules. Il existe différents modes de division symétrique et asymétrique, cependant la division symétrique donne toujours deux cellules de même nature (Noctor *et al*., 2008).

L'occurrence exclusive d'une division symétrique est donc peu probable dans le cas des cellules gliales radiaires du cerveau du poisson zèbre adulte. L'hypothèse serait donc que ces cellules sont capables de se diviser de manière asymétrique et symétrique, en fonction du besoin en un type particulier de cellules. En effet, il a déjà été observé chez les mammifères qu'en cas d'un besoin en neurones, les cellules gliales vont se diviser de manière asymétrique

(« neurogenèse »), tandis qu'elles vont se diviser de manière symétrique si le « stock » de cellules progénitrices doit être augmenté (« gliogenèse ») (Huttner and Kosodo, 2005; Noctor *et al*., 2008). D'autre part, les processus de division asymétrique entraînent une ségrégation de l'expression de facteurs spécifiques. Par exemple, Numb qui est un facteur connu pour intervenir dans les processus de division asymétrique et important pour le développement embryonnaire chez la drosophile et qui a également été découvert chez l'homme, les rongeurs et les poulets, est présent dans la cellule fille, mais pas la cellule mère. D'autres facteurs comme la Neuroréguline 2 (Ngn2) et Pax 6 se retrouvent également exprimés dans les cellules filles après division asymétrique (Miyata *et al*., 2004; Pontious *et al*., 2008; Shen *et al*., 2002). Lors du développement du poisson zèbre, Numb est également impliqué dans l'orientation de la destinée cellulaire et la division asymétrique (Reugels *et al*., 2006). De même, Notch 1 serait un facteur important pour la division asymétrique, puisqu'il semblerait que toutes les cellules capables de division asymétrique expriment Notch1. Il serait impliqué dans la régulation de ces processus et de la ségrégation de facteurs spécifiques dans les cellules filles (Chenn and McConnell, 1995; Hatakeyama and Kageyama, 2006). Durant le développement précoce du poisson zèbre, Notch 1 est présent dans toutes les zones prolifératives du cerveau (Mueller and Wullimann, 2003) et la voie de signalisation Notch serait impliquée dans la spécification « gliale » des cellules lors du développement (Cornell and Eisen, 2005; Dutta *et al*., 2008). Par ailleurs, chez la souris, Notch est nécessaire au maintien de l'expression de BLBP dans les cellules gliales radiaires (Feng and Heintz, 1995). Il serait donc intéressant d'étudier la localisation et l'expression de Notch mais également de Numb dans le cerveau antérieur de poisson zèbre adulte, afin de mieux comprendre les processus de divison et leurs rôles respectifs dans ces processus.

Enfin, un dernier argument semble être en faveur de l'occurrence de processus de division asymétrique chez le poisson zèbre adulte : la perte rapide de l'expression de l'aromatase B par la cellule fille après division. En effet, nous avons observé que les cellules nouvellement générées BrdU-positives perdent rapidement l'expression de l'aromatase ; aussi, il semblerait que lors des processus de division asymétrique, la cellule fille garde très peu de cytoplasme par rapport à la cellule mère (communication personnelle, A. Kriegstein). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression d'autres marqueurs de cellules gliales radiaires afin de voir si les cellules nouvellement générées perdent aussi rapidement l'expression de ces marqueurs. Les poissons zèbre transgéniques aromatase B-GFP seraient un bon outil pour visualiser *in vivo* par time-lapse le temps nécessaire à la perte d'expression de l'aromatase

après division.

I-2 Nature et rôle des cellules BrdU positives/aromatase B négatives ?

Une observation intéressante est la présence, en bordure de ventricule, de cellules BrdU-positives qui n'expriment pas l'aromatase B. Ces cellules sont-elles donc des cellules gliales radiaires ou d'un autre type cellulaire ? Dans le cas où elles seraient des cellules gliales radiaires, cela impliquerait donc que l'aromatase B ne marque pas toutes les cellules de ce type. Jusqu'à présent, la caractérisation de ces cellules était rendue difficile par le manque d'anticorps spécifiques. La génération récente d'anticorps spécifiques et/ou de modèles de poissons transgéniques permet maintenant d'aborder cette caractérisation plus facilement chez les poissons. Par exemple, des travaux réalisés au laboratoire avec un anticorps dirigé contre la BLBP ont montré que cette protéine est exprimée dans les cellules gliales radiaires du cerveau adulte de poissons zèbre. La BLBP est une protéine intervenant dans le métabolisme des acides gras dans le cerveau et constitue un marqueur de cellules progénitrices chez les mammifères et oiseaux (cellules gliales radiaires pendant le développement et astrocytes chez l'adulte). Si la majorité des cellules BLBP-positives se sont avérées être aromatase-B positives, deux autres sous-populations de cellules gliales radiaires ont néanmoins été décrites, l'une exprimant uniquement la BLBP, l'autre exprimant uniquement l'aromatase B. L'hypothèse est donc que, comme cela est le cas chez les mammifères (Hartfuss *et al*., 2001; Malatesta *et al*., 2003), les cellules gliales radiaires du poisson zèbre exprimeraient ces marqueurs de façon différentielle: BLBP seule, aromatase B seule ou les deux. Des résultats très récents, obtenus en collaboration avec Laure Bailly-Cuif et Uwe Strahle, sont en faveur de cette hypothèse. En effet, l'utilisation de poisson zèbres transgéniques, notamment GFAP/GFP, Aromatase B-GFP et Nestine-GFP, a permis de décrire des populations de cellules exprimant des combinaisons de marqueurs différents soulignant l'hétérogénéité de ces cellules, hétérogénéité dont le sens nous échappe à l'heure actuelle.

Ces différentes combinaisons de plusieurs marqueurs amènent la question de savoir si ces protéines peuvent être exprimées en même temps ? En d'autres termes, est-ce que ces marqueurs constituent simplement des « marqueurs » ou bien ont-ils un rôle, une signification physiologique ? Ainsi, en fonction de leur chronologie d'expression, une certaine combinaison de ces différents « marqueurs » permettrait aux cellules gliales radiaires d'exercer des fonctions différentes. La BLBP est, par exemple, plus qu'un simple marqueur, puisque, en agissant de façon paracrine, cette protéine joue, en relation avec la reeline, un rôle

majeur dans la migration des neurones le long des prolongements radiaires (Hartfuss *et al*., 2003). Un facteur de croissance glial (GGF)**,** exprimé dans les neurones en migration, régulerait également la BLBP et favoriserait l'extension des prolongements radiaires permettant ainsi la migration des neurones (Anton *et al*., 1997). Différentes données montrent que la régulation de la BLBP fait intervenir différents facteurs qui permettent ainsi le maintien du phénotype des cellules gliales radiaires et favorise la migration de neurones le long des prolongements de ces cellules (Feng and Heintz, 1995). L'aromatase, quant à elle, est l'enzyme de synthèse de l'E2 et étant donné les rôles de cette hormone dans les processus de neurogenèse chez les mammifères, il est fort probable que l'aromatase soit bien plus qu'un simple « marqueur » de cellules gliales radiaires chez les poissons. Des expériences de triple marquage BrdU/aromatase B avec d'autres marqueurs de cellules gliales radiaires permettront donc de déterminer la nature des ces cellules qui se divisent mais qui ne sont pas aromatase B positives.

I-3 Persistance des cellules gliales radiaires chez les poissons adultes : la clé de l'intense neurogenèse chez les poissons ?

Chez les mammifères, à la fin de la neurogenèse embryonnaire, les cellules gliales radiaires régressent et se différencient en astrocytes. Au contraire, chez les poissons téléostéens, ces cellules gliales radiaires persistent à l'âge adulte dans tout le cerveau (Onteniente *et al*., 1983). Il est également intéressant de constater que les cellules gliales radiaires sont également présentes chez les oiseaux adultes et que leur distribution non homogène correspond aux « hot spots » de neurogenèse (Alvarez-buyilla *et al*, 1990). La persistance des cellules gliales radiaires et leur rôle de cellules progénitrices dans le cerveau des poissons adultes est certainement un élément clé de la forte activité neurogénique adulte.

I-4 Et les astrocytes ?

Nos expériences de double marquage aromatase B/marqueurs neuronaux montrant très peu « d'espace » pour d'autres types cellulaires, en particulier d'astrocytes, la présence de telles cellules pourrait simplement être difficile à détecter. Leur rôle fondamental dans la régulation de l'environnement neuronal, *via* une recapture des ions ou des neurotransmetteurs, ainsi que leurs rôles dans la signalisation calcique et dans la communication cellule-cellule (Rossi *et al*., 2007; Volknandt, 2002) tend à suggérer que ces cellules, ou des cellules ayant les mêmes fonctions, sont bien présentes dans le cerveau adulte des poissons, même si très peu d'informations existent chez ces espèces. Aussi, même si nous n'avons pas observé ce type

cellulaire chez le poisson zèbre jusqu'à présent, leur présence ne peut cependant pas être écartée. De plus, des astrocytes ont déjà été observés dans le cerveau de poissons téléostéens comme la truite et la carpe, une espèce phylogénétiquement proche du poisson zèbre. En effet, des expériences d'immunohistochimie avec un anticorps anti-GFAP chez ces deux animaux ont révélé la présence de nombreuses cellules gliales radiaires et également quelques astrocytes. Néanmoins, ces astrocytes sont très peu nombreux et leur localisation est restreinte au cerveau postérieur chez la carpe (Kalman, 1998) ou au cerveau postérieur et moelle épinière chez la truite (Alunni *et al*., 2005). Jusqu'à présent, seuls des marquages immunohistochimiques avec un anticorps anti-protéine S100 ont montré l'existence d'astrocytes chez le pejerrey (*Odontesthes bonariensis,* Atheriniforme) dans le cerveau antérieur, là encore en très faible nombre (Pablo Strobl-Mazulla, communication personnelle). Il est également possible que la proportion d'astrocytes augmente, au cours de l'évolution des Poissons téléostéens, avec la complexité de certaines structures notamment au niveau du télencéphale.

D'un autre côté, chez les mammifères, les astrocytes apparaissent à la fin de la neurogenèse embryonnaire, lorsque les cellules gliales radiaires régressent et se différencient en astrocytes (Noctor *et al*, 2002). De plus, ce sont ces astrocytes dérivant de cellules gliales radiaires embryonnaires, qui constituent les cellules progénitrices neuronales (Alvarez-Buylla *et al*., 2002; Merkle *et al*., 2004). Aussi, la présence de très peu d'astrocytes chez les poissons pourrait être expliquée par le fait que les cellules gliales radiaires, qui sont toujours présentes dans le cerveau adulte, « joueraient » le rôle des astrocytes. En faveur de cette hypothèse, deux structures nerveuses présentent des « cellules gliales radiaires » chez l'adulte, la glie de Müller dans la rétine et la glie de Bergmann dans l'hippocampe. Ces cellules sont connues pour être impliquées dans la plasticité synaptique et la communication bidirectionnelle avec les neurones (Fisher and Lewis, 2003; Yamada and Watanabe, 2002).

II- Pourquoi une telle sensibilité de l'aromatase B à l'E2 dans le cerveau des poissons ?

En plus d'une forte activité neurogénique, une particularité importante des poissons est la très forte expression de l'aromatase B, l'enzyme de synthèse de l'E2, dans les cellules gliales radiaires. La signification physiologique de cette régulation positive de l'aromatase par l'E2 demeure pour l'instant inconnue et nous en sommes réduits à émettre des hypothèses.

II-1 La combinaison des régulations œstrogéniques et androgéniques de l'aromatase B est-elle seule responsable de la forte expression de l'aromatase ?

Durant cette thèse, nous avons tenté d'approfondir les mécanismes de régulation de l'aromatase B par les stéroïdes sexuels. Nous avons ainsi montré que la T était capable de réguler positivement l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires et que cette régulation implique les ERs. Ces observations sont en faveur d'une régulation œstrogénique de l'aromatase B par la T qui passerait par une aromatisation de la T. Nous avons également montré que l'aromatase B est régulée par la DHT. Cette « découverte » est plus inattendue, la DHT étant un androgène non aromatisable. De plus, cette stimulation implique non pas les ARs mais les ERs, et passerait probablement par une conversion de la DHT en βdiol. Les mécanismes de régulations de l'aromatase par ces androgènes semblent donc équivalent à ceux observés avec l'E2 (Le Page *et al*., 2008; Le Page *et al*., 2006; Menuet *et al*., 2005). Cette régulation de l'aromatase B par les œstrogènes et certains androgènes pourrait expliquer la très forte expression de l'aromatase dans les cellules gliales radiaires, de loin supérieure à celle observée chez les mammifères (Pasmanik *et al*., 1988). En effet, le gène *cyp19* est soumis à une faible régulation par les androgènes chez les mammifères et par les androgènes et les œstrogènes chez les oiseaux (Roselli, 2007). Il convient de noter ici que, chez les poissons, il existe moins de différences entre les taux d'androgènes et d'œstrogènes entre les sexes. En effet, contrairement aux mammifères chez lesquels la T est considérée comme l'hormone « mâle », chez les poissons, la testostérone joue des rôles importants dans les animaux des deux sexes, un pic de testostérone précédant l'ovulation chez les femelles par exemple chez les salmonidés (Estay *et al*., 2003; Kime and Dolben, 1985; Trudeau *et al*., 1991). De plus, il semblerait qu'il n'existe pas de différence majeure d'expression de l'aromatase entre poissons zèbre mâles et femelles que ce soit chez l'adulte ou au cours du développement (Kallivretaki *et al*., 2007).

Notre étude sur l'expression spatio-temporelle de l'aromatase B et des ERs au cours du développement a montré un parallélisme assez frappant entre l'apparition des messagers des ERβ et ceux de l'aromatase B, suggérant un lien fonctionnel entre ces acteurs. Par ailleurs, le fait que l'ICI soit capable de bloquer en grande partie l'expression des messagers de l'aromatase, suggère également que cette expression dépend en large part de l'activation de ces récepteurs. A ces stades de développement, la seule exposition à des œstrogènes et certains androgènes suffit à stimuler de façon spectaculaire l'expression de l'aromatase dans les cellules gliales radiaires et seulement dans ces cellules.

Il semble donc que, dans tous les cas, il existe une corrélation très étroite entre niveau de stéroïdes et expression de l'aromatase. Ceci permet d'expliquer en partie la forte activité aromatase mise en évidence il y a une trentaine d'années chez les poissons matures avec naturellement de forts niveaux de stéroïdes circulants.

II-2 Y a-t-il une synthèse complète des stéroïdes dans les cellules gliales radiaires ?

La régulation de l'aromatase B par la DHT, un androgène non aromatisable, *via* les ERs suggère fortement une métabolisation en βdiol. Ces résultats peuvent donc indiquer que le cerveau de poisson zèbre exprime l'enzyme de conversion de la DHT en βdiol, la 3β-HSD. Peu d'informations sont disponibles concernant la synthèse de neurostéroïdes chez les poissons, mais il a été démontré que cette enzyme est exprimée dans les neurones du cerveau de poisson zèbre (Sakamoto *et al*., 2001). Cette enzyme est responsable de plusieurs réactions enzymatiques, dont la conversion de la prégnénolone en progestérone et de la hydroxyprégnénolone en hydroxyprogestérone, qui sont en amont de la synthèse de βdiol (**Figure 24**). En prolongement de ces observations, il est légitime de se poser la question de savoir si le substrat de l'aromatase est nécessairement d'origine périphérique ou si une synthèse locale complète d'androgènes aromatisables à partir du cholestérol est possible dans le cerveau des poissons.

Cette hypothèse n'est pas invraisemblable dans la mesure où l'ensemble des enzymes de la stéroïdogenèse ont été détectées par RT-PCR en temps réel, pendant le développement du pagre à tête noire (Tomy *et al*., 2007) ou de la truite (Vizziano *et al*., 2007). Comme chez les oiseaux (Schlinger and London, 2006), des expériences d'hybridation *in situ* ont montré la présence de toutes les enzymes de la stéroïdogenèse dans le cerveau de poissons zèbre adultes, en bordure de ventricule (Sok-Keng Tong, communication personnelle). Les cellules gliales radiaires étant également situées dans cette région, ceci pourrait donc confirmer la présence de la 3β-HSD responsable notamment de la synthèse de βdiol dans ces cellules et donc la régulation de *cyp19a1b* par la DHT *via* les ERs. La localisation exacte de ces enzymes, et notamment leur expression dans les cellules gliales radiaires, doit cependant être étudiée de façon approfondie. Il serait également intéressant d'utiliser des inhibiteurs d'activité de l'aromatase et des antagonistes de la 3β-HSD, afin de montrer que l'effet inducteur de la testostérone sur le gène *cyp19a1b* passe bien par une aromatisation et celui de la DHT par une conversion en βdiol. Enfin, si la synthèse de stéroïdes est possible localement, une autre question peut-être de savoir quelle est l'origine des stéroïdes dans le cerveau :

périphérique locale, ou une combinaison des deux, différents fonctions pouvant peut-être régulées par ces stéroïdes d'origine différente.

III- Y a t-il un lien entre aromatase, E2 et neurogenèse chez les poissons et ce lien pourrait-il être responsable du maintien et de la forte activité neurogénique chez les poissons ?

III-1 Aromatase, œstradiol et neurogenèse

L'hypothèse selon laquelle la production d'œstradiol dans les cellules gliales radiaires pourraient être étroitement liée à la neurogénèse adulte est discutée dans la revue ***« Mouriec et al., 2008 ; Brain Research Bulletin »*** présentée ci après. Cet article explore également la possibilité que les poissons présentent en fait une situation exagérée d'un mécanisme existant chez tous les Vertébrés mais de manière plus discrète.

ELSEVIER

Brain Research Bulletin 75 (2008) 274–280

BRAIN RESEARCH BULLETIN

www.elsevier.com/locate/brainresbull

Review

Synthesis of estrogens in progenitor cells of adult fish brain: Evolutive novelty or exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis?

K. Mouriec [a], E. Pellegrini [a], I. Anglade [a], A. Menuet [a], F. Adrio [b], M.L. Thieulant [a], F. Pakdel [a], O. Kah [a,*]

[a] *Neurogenesis and Estrogens, UMR CNRS 6026, IFR 140, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France*
[b] *Department of Cell Biology and Ecology, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain*

Received 6 September 2007; accepted 17 October 2007
Available online 20 November 2007

Abstract

In contrast to other vertebrates, in which the adult brain shows limited adult neurogenesis, teleost fishes exhibit an unparalleled capacity to generate new neurons as adults, suggesting that their brains present a highly permissive environment for the maintenance and proliferation of adult progenitors. Here, we examine the hypothesis that one of the factors permitting establishment of this favourable environment is estradiol. Indeed, recent data showed that radial glial cells strongly expressed one of two aromatase duplicated genes. Aromatase is the estrogen-synthesizing enzyme and this observation is of great interest, given that radial glial cells are progenitor cells capable of generating new neurons. Given the well-documented roles of estrogens on cell fate, and notably on cell proliferation, these data suggest that estradiol could be involved in maintaining and/or activating these progenitors. Examination of recent data in birds and mammals suggests that the situation in fish could well be an exaggeration of a more general mechanism implicating estrogens in neurogenesis. Indeed, there is accumulating evidence that estrogens are involved in embryonic, adult or reparative neurogenesis in other vertebrates, notably in mammals.
© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Aromatase; Radial glial cells; Neurogenesis; Zebrafish; Teleost fish; Estradiol; Estrogen receptor

Contents

1. Introduction 274
2. Teleost fish are the champions of adult neurogenesis 275
3. Aromatase, the estrogen-synthesizing enzyme, is strongly expressed in radial glial cells of the adult fish brain 275
4. Radial glial cells are progenitor cells in adult fish 276
5. Emerging new functions of estrogens in embryonic, adult or reparative neurogenesis 276
6. What triggers aromatase expression in the brain of fish? 277
7. Conclusions 278
Acknowledgements 278
References 278

1. Introduction

For a long time, it has been a prevailing dogma in neuroscience that the adult brain is unable to generate new neurons. Pioneer studies by Altman [2] or Kaplan and Hinds [31] suggesting that this assumption could be wrong, were received with scepticism or even criticism. Nowadays, it is well accepted that neurogenesis persists in discrete regions of the adult mammalian brain. However, active adult neural progenitors are restricted to two small areas of the telencephalon, the subependymal zone of the lateral ventricle (SEZ) and the subgranular zone (SGZ)

* Corresponding author. Tel.: +33 2 23 23 67 65; fax: +33 2 23 23 67 94.
E-mail address: olivier.kah@univ-rennes1.fr (O. Kah).

0361-9230/$ – see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.brainresbull.2007.10.030

of the dentate gyrus in the hippocampus [29,42]. These findings stimulated a considerable number of studies aiming at isolating neural stem cells and understanding their basic biological properties, with the ultimate objective to manipulate them and enhance repair and regeneration.

It is now established that the capacity to produce new neurons as adults is a common feature of all vertebrates and also invertebrates [41]. In non-mammalian tetrapods, neurogenesis is most documented in birds where generation of new neurons appears restricted to a single region, the periventricular zone of the lateral ventricle. This also seems to be the case in lizards [41], whereas in amphibians adult neurogenesis is poorly documented apart from the olfactory bulb and retina [41]. In contrast, there is increasing information for teleost fish, which seem to have an unparalleled capacity to produce new neurons during the adult stages.

2. Teleost fish are the champions of adult neurogenesis

Teleost fish represent the largest group of actinopterygian fish, a lineage that diverged some 450 millions years ago from the sarcopterygian fish, their tetrapod ancestors. Whereas there is unfortunately little data on adult neurogenesis in the basal representatives of actinopterygians, holosteans (*Amia, Lepisosteus*, ...) and chondrosteans (sturgeon), there is quite a lot of evidence suggesting that the adult brain of teleosts exhibits a unique capacity to generate new neurons. In the late 60s, pioneer studies [34,36,37] demonstrated extensive cell proliferation in the telencephalon, diencephalon, cerebellum and spinal cord of fish. Using tritiated thymidine it was shown that, although the proliferative activity decreased progressively with age and size, the brain of the guppy still exhibited significant proliferative activity in the adult [37]. Since then, the existence of widespread periventricular proliferative zones (PZ) was confirmed in different teleost species [41]. In the stickleback, detailed comparisons of tritiated thymidine incorporation with PCNA and BrdU immunohistochemistry showed the presence of many proliferation zones in the entire brain; although the number of proliferative cells seemed to be more important in the telencephalon, diencephalon and mesencephalon [16]. This study demonstrated that all these PZ were located within or immediately below the ventricular layer, with the exception of the cerebellum in which proliferation occurred in the parenchyma. More recently, several studies further documented the presence of mitogenic zones capable of generating new neurons in many parts of the telencephalon, diencephalon, midbrain and cerebellum of zebrafish [1,27,56,73]. These data confirmed that adult fish exhibit an enormous potential for neurogenesis, compared to tetrapods, and that adult neurogenesis not only occurred in regions homologous to neurogenic regions in mammals, but also in many other regions throughout the entire brain. This is most likely linked to the fact that fish keep growing during their entire lifespan, making it necessary to constantly generate new neurons [8,9]. This, of course, suggests that in addition to the high proliferative activity, other cellular processes such as apoptosis, migration, and differentiation must occur, but these are poorly documented.

Thus, the question is: Why do fish adult stem cells maintain their mitogenic activity in many regions, whereas in other vertebrates adult neurogenesis is limited to just one or two discrete areas? Recent data in mammals indicate that a combination of intrinsic and extrinsic cues dictates the behaviour of adult neural progenitor [29,51]. In this review, we would like to examine the possibility that one of the mechanisms participating in the establishment of a highly permissive environment in the adult fish brain could be linked to their unique capacity to produce estrogens, because of a strong expression of the estrogen-synthesizing enzyme aromatase (estrogen synthase). Indeed, apart from this exaggerated proliferative activity, another major feature of the adult fish brain is its exceptionally high aromatase activity. Despite the fact that this has been known for some time, the significance of this peculiarity is still not clearly understood [54,55].

3. Aromatase, the estrogen-synthesizing enzyme, is strongly expressed in radial glial cells of the adult fish brain

The terminal step of estrogen biosynthesis is catalyzed by an enzyme complex termed aromatase (estrogen synthase). This key complex, bound to the endoplasmic reticulum membrane, is formed by the cytochrome P450 aromatase, a heme binding protein produced by the *cyp19* gene, and by an ubiquitous flavoprotein, the NADPH cytochrome P450 reductase [40]. Aromatase is expressed in the brain of all vertebrates [7], but fish exhibit several interesting and unique features compared to mammals and birds. Firstly, it is known that the total amount of enzymatic activity of aromatase (pmol/mg protein) in the brain of fish is one hundred to one thousand times higher than in corresponding regions of mammals and birds [12,54]. Microanatomical and biochemical techniques have shown that an exceptional potential for aromatization takes place in the forebrain of fish, particularly in the telencephalon, preoptic area and the hypothalamus [67]. Secondly, teleosts possess two aromatase genes in their genome. In mammals and birds, aromatase is generated from a single cyp19 gene that is regulated by multiple tissue-specific region promoters and alternative splicing, resulting in transcript variants but identical coding sequences [11]. In most fish, there are two distinct genes, *cyp19a* and *cyp19b*, each of which is regulated differently and encodes a structurally and functionally different aromatase protein [15,66]. Data from a large sample of fish showed that the two genes have consistently different patterns of expression, CYP19A (aromatase A) is predominantly expressed in the gonads while CYP19B (aromatase B: AroB) is mainly expressed in the brain [15,24,48,66], providing a good example of partition of function between duplicated genes [60].

In the brain of birds and mammals, aromatase was for a long time only reported in neurons, notably of the diencephalon and limbic systems [7,72]. However, more recently aromatase was described in radial cells of the developing cortex in the mouse [45] and in astrocytes of the adult human cortex [71]. In contrast, another unique characteristic of teleosts is the fact that AroB expression in adults is strictly confined to radial glial cells. Such

cells are characterized by a small nucleus adjacent to the ventricle and long radial processes terminating by end feet at the brain surface [59]. Radial cells are strongly involved in embryonic neurogenesis and, in contrast to mammals where they disappear at the end of neurogenesis, they largely persist in the adult brain of non-mammals, notably in fish. Strong expression of AroB in radial glial cells of fish was first shown in the plainfin midshipman [18] and then in trout, zebrafish, pejerrey and bluehead wrasse [44,48,50,63]. In the trout and zebrafish we showed that both AroB mRNA and protein expression, in adult mature fish, are strictly confined to radial glial cells. These AroB-expressing cells are most abundant in the forebrain, notably in the olfactory bulbs, the telencephalon, the preoptic area and the mediobasal hypothalamus, in particular along the lateral and posterior recesses [50]. However, consistent with the distribution of the messengers [48], AroB-positive cells were also observed in the periventricular layers bordering the optic tectum, the torus semicircularis and along the fourth ventricle [48,50].

The fact that aromatase B is expressed in radial glial cells in the brain of adult teleosts is also supported by the observation that such cells express a variety of markers; in particular brain lipid binding protein (BLBP), a nervous system-specific member of the large family of hydrophobic ligand binding proteins, which is exclusively expressed in radial glial cells and astrocytes throughout the developing brain [1,5,6]. BLBP displays very high expression in radial glial cells of zebrafish [1] where it is often co-expressed with AroB (Mouriec and Diotel, unpublished data). In addition, the exclusive expression of AroB in radial glial cells was confirmed by the fact that none of these cells express markers of post-mitotic neurons such as HuC/D, a RNA-binding protein selectively expressed in neurons, or acetylated-tubulin [18,56].

4. Radial glial cells are progenitor cells in adult fish

The role of radial glial cells in embryonic neurogenesis is well established in birds and mammals. First known for serving as scaffolds for neuronal migration during embryonic neurogenesis [59], radial glial cells are now considered as progenitor cells able to generate glial cells (astrocytes, oligodendrocytes and ependymal cells) and neurons [25,26,52,53]. More recently, data showed that radial glial cells are the source of all brain neurons not only during development, but also in adults [26]. In birds, adult neurogenesis results from asymmetric division of the radial glial cells, which give rise to newborn neurons migrating tangentially and radially along radial extensions to reach the telencephalon [4]. In adult mammals, astrocytes from the subventricular zone act as stem cells, which divide to generate precursors ultimately generating neurons, some of which migrate to colonize olfactory bulbs [42]. Nevertheless, radial glial cells disappear after the embryogenesis in mammals [52,53]. In contrast, radial glial cells persist in other vertebrates, notably in birds [3] and fish [48,59]. However, it is only recently that the implication of radial cells in adult neurogenesis has been envisioned. Recent data in zebrafish have further confirmed the very high proliferative activity of the brain, already documented in other teleost species [1,27,56,73]. Using BrdU immunohistochemistry and aromatase B as a marker of radial glial cells it was found that, at short survival times (12 and 24 h), a large majority of cells exhibiting BrdU labelling corresponded to AroB-positive radial cells [56]. The radial nature of proliferative cells in the telencephalon and diencephalon was also indicated using antibodies to BLBP [1]. In addition, it was shown that, over time, newborn cells clearly move away from the periventricular proliferative zones, as indicated by double BrdU/PCNA staining [1,56,73], using radial processes as scaffolds [56]. Whilst in most of the forebrain newborn cells appear to move radially, actively dividing cells from the ventral subpallium generate rapidly dividing progenitors and neuroblasts that reach the olfactory bulb via a rostral migratory stream [1]. In the zebrafish, many of the newborn cells differentiate into neurons, as shown by combining BrdU and the use of several neuronal markers such as Hu or acetylated-tubulin [1,27,56,73]

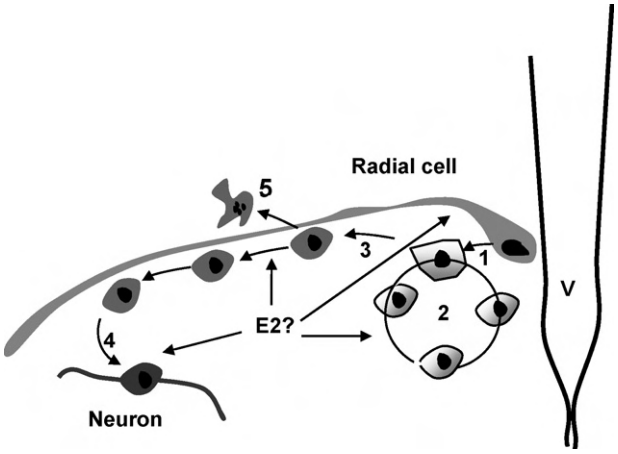


Fig. 1. Schematic representation of the current hypothesis regarding the role of radial glial cells in adult neurogenesis in fish. Radial glial cells divide by asymmetric division and give birth to new cells (1). Such newborn cells can occasionally further divide (2) or migrate along the long radial processes (3) to give birth to neurons (4). It is also possible that newborn cells undergo apoptosis (5). A large number of in vivo and in vitro data have demonstrated that estradiol has the capacity of modulating all these cellular activities.

Thus, at least a subset of AroB-positive radial glial cells represents progenitor cells and is capable of actively dividing to generate new neurons. As mentioned above, aromatase is the only synthetic enzyme of estrogens; indicating that, provided aromatizable androgens are available, such cells will produce locally high amounts of estrogens that will act in a paracrine or autocrine fashion in these periventricular proliferative regions (Fig. 1). Although preliminary results (Mouriec, unpublished data) indicate that E2 modulates cell proliferation in zebrafish, this remains to be thoroughly evaluated. However, increasing evidence suggests that estrogens may promote neurogenesis in other vertebrate models.

5. Emerging new functions of estrogens in embryonic, adult or reparative neurogenesis

Due to its well-documented synchronizing effects on the reproductive axis, estradiol (E2) is best known as a female sexual steroid. However, it is now considered, in both males and

females, as a hormone exhibiting a myriad of neurotrophic and neuroprotective functions that are essential for neuronal development, survival and plasticity throughout life [22,23,62]. This variety of effects is correlated to the diversity of the cellular and molecular mechanisms underlying estrogen actions. Indeed, estrogenic effects may rely on activation of specific intracellular estrogen receptors, ERα and ERβ. These intracellular estrogen receptors modulate gene expression and produce long-term genomic effects on interaction with plasma membrane sites that produce rapid non-genomic actions, and also on a growing number of receptor-independent mechanisms [69].

Estradiol is present in the brain of vertebrates from developmental stages until adulthood and is known for influencing neuronal differentiation, survival and plasticity [10,22,64,69]. However, a number of recent data suggest that estrogen could also influence the behaviour of progenitors and influence neurogenesis.

In rodents, it is known that brain aromatase activity is maximal during the embryonic period [40]. While aromatase was mostly believed to influence the construction of male-specific structures according to the aromatization hypothesis [47], it was recently reported that aromatase is strongly expressed in radial cells of the embryonic neocortex and that such aromatase-expressing radial cells also express ERα [45]. Furthermore, in vitro E2 administration increased proliferation, while in utero blockade of estrogen receptors decreases proliferation of these embryonic cortical progenitor cells [45]. These data, whilst not forgetting the situation in adult fish [56], suggest a new functional role for E2 as a proliferative agent during critical stages of cerebral cortex development [45]. Such findings are in agreement with the fact that the brains of adult ERβ−/− knockout mice show regional neuronal hypocellularity, especially in the cerebral cortex [30]. While in rodents, the source of aromatizable androgens necessary for estrogen production in the cortex is not known, recent studies in songbirds (at posthatch day 1 and 5) indicated that all the genes required for *de novo* estrogen synthesis from cholesterol are expressed in the developing brain of both sexes, with a spatial distribution similar to the known pattern of proliferating neuronal precursors along the lateral border of the lateral ventricle [43].

De novo synthesis of estrogens from cholesterol is also documented in neurogenic regions in the adult rodent, notably in the hippocampus, where the E2 concentrations can be higher than in the blood [28].

There is also rapidly accumulating data showing that estradiol modulates adult neurogenesis in the dentate gyrus of normal [17,20,21] or diabetic rats [61,62], a mechanism that would implicate ERα and ERβ [46]. Furthermore, the anatomical and functional implications of brain aromatase expression in the neurogenesis construction of vocal and auditory circuits in teleost fishes and songbirds are also well documented [19,57].

In addition, estrogens have long been known for acting as a neuroprotective factor under brain repair situations. Until recently [45,71], aromatase expression had been reported in astrocytes (in rat) or in radial glial cells (in birds) only after chemical or mechanical lesions [23,57,58]. More lately, this increase in estrogen production around the lesions is correlated with increased neurogenesis as demonstrated by several recent studies [39,70]. Furthermore, it was shown that estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through ERα and ERβ signalling [65].

All these data suggest that estrogens should be taken into consideration among other factors potentially regulating embryonic, adult and reparative neurogenesis. If it is clear that estrogens are locally produced in neurogenic regions, notably in the vicinity or even within progenitor cells, many questions remain open regarding the significance of these data. Open questions notably concern the regulation of brain aromatase expression and the origin, central or peripheral, of aromatizable androgenic precursors.

6. What triggers aromatase expression in the brain of fish?

The promoter of the zebrafish cyp19b gene has been characterized by several groups [13,32,50,68]. Analysis of the promoter sequence revealed the presence of a TATA box, several putative *cis* regulatory elements including an estrogen-responsive element (ERE) and an half ERE and pioneer studies indicated that AroB is up-regulated by E2, its own product [33,35]. Of particular interest is the finding that if embryos are treated for 2, 3 or 5 days with E2 (10 nM) a very strong up-regulation of AroB messenger, protein and activity is observed exclusively in the radial glial cells of zebrafish larvae [50]. This effect is entirely blocked by an excess of the pure anti-estrogen ICI 182 780, indicating the requirement of one of the three zebrafish estrogen receptors [49]. The fact that ERs are necessary for the up-regulation of AroB, but not sufficient alone, is further evidenced by the fact that ER are expressed in many cells in the brain parenchyma that do not express AroB [49]. This is further indicated by in vitro studies showing that E2 up-regulation of an AroB-reporter gene in the presence of E2 was only observed in certain cell contexts, again indicating the need of specific factors. Interestingly, strong up-regulation of the zebrafish AroB-luciferase reporter in the presence of zebrafish ER was observed only in P19 cells, differentiated into neurons and glial cells by retinoic acid, or in U251-MG human astrocytes indicating that a "neuroglial" cell context is necessary [14,38,55]. These data correlate well with the fact that deletion/mutation of the ERE on the AroB promoter results in the total absence of E2 induction. Interestingly, deletion/mutation of a sequence upstream of the ERE, named GxrE, also prevents the E2 stimulation of the AroB-luciferase even when the ERE is intact. As shown by gel shift experiments, this sequence is able to bind nuclear extracts from P19 cells differentiated into neurons and glial cells by retinoic acid, or in U251-MG human astrocytes, but not from other cell lines [50]. These data suggest that ER could act in cooperation with some unknown neuroglial factor to promote the up-regulation of the cyp19b gene in neuroglial or glial cells (Fig. 2). So, our hypothesis is that a positive autoregulatory loop explains the high expression of Aro-B in radial glial cells of adult fish. Indeed, high circulating steroid levels will further promote AroB expression in radial cells. Whether such

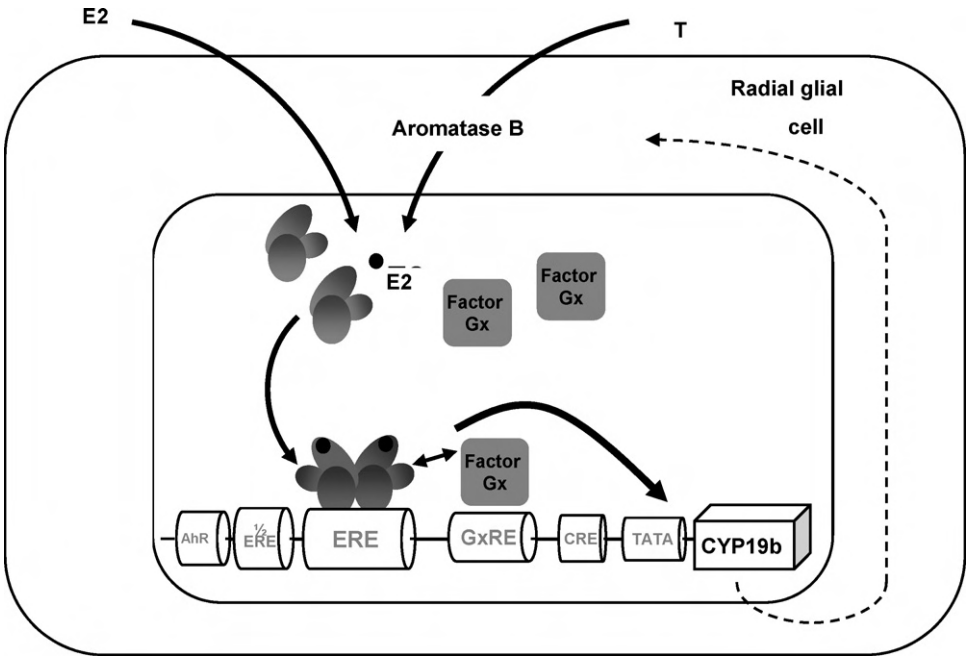


Fig. 2. Schematic representation of the current hypothesis for the strong aromatase B expression in the radial cells of fish. A mandatory cooperation between estrogen receptor and a "glial"-specific factor (Gx), binding onto a GxRE sequence upstream the ERE, results in a high sensitivity of the *cyp19b* gene to E2. This hypothesis also explains why testosterone (T) also up-regulates aromatase B expression.

a mechanism is also implicated in expression of aromatase in other vertebrates is unknown and requires urgent investigation.

7. Conclusions

These data stress the originality of the teleost fish brain in which progenitor radial glial cells, and not neurons, strongly express the estrogen-synthesising enzyme, aromatase. Until recently, it was thought that aromatase expression in radial cells was a unique feature of teleosts, but very recent data suggest that aromatase is expressed in radial glial cells during embryogenesis or under brain repair situations in other vertebrates. In addition, an increasing number of studies point to the role of estrogens in cell proliferation and neurogenesis. Overall, this suggests that the brain of adult fish possibly presents an exaggeration of a more general mechanism involving estrogens in embryonic, adult and reparative neurogenesis.

Acknowledgements

The research from our laboratory presented in this review was supported by grants form the CNRS, the Ministry of Research and Education and the European Union (EDEN Project). We thank Miranda Maybank for improving the English style.

References

[1] B. Adolf, P. Chapouton, C.S. Lam, S. Topp, B. Tannhaüser, U. Strahle, M. Gotz, L. Bally-Cuif, Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon, Dev. Biol. 295 (2006) 278–293.

[2] J. Altman, Are new neurons formed in the brains of adult mammals? Science 135 (1962) 1127–1128.

[3] A. Alvarez-Buylla, D.R. Buskirk, F. Nottebohm, Monoclonal antibody reveals radial glia in adult avian brain, J. Comp. Neurol. 264 (1987) 159–170.

[4] A. Alvarez-Buylla, B. Seri, F. Doetsch, Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain, Brain Res. Bull. 57 (2002) 751–758.

[5] T.E. Anthony, C. Klein, G. Fishell, N. Heintz, Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system, Neuron 41 (2004) 881–890.

[6] T.E. Anthony, H.A. Mason, T. Gridley, G. Fishell, N. Heintz, Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells, Genes Dev. 19 (2005) 1028–1033.

[7] J. Balthazart, G.F. Ball, New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase), Trends Neurosci. 21 (1998) 243–249.

[8] R. Brandstätter, K. Kotrschal, Brain growth patterns in four European cyprinid fish species (Cyprinidae, Teleostei): roach (*Rutilus rutilus*), bream (*Abramis brama*), common carp (*Cyprinus carpio*) and sabre carp (*Pelecus cultratus*), Brain Behav. Evol. 35 (1990) 195–211.

[9] R. Brandstätter, K. Kotrschal, Life history of roach, *Rutilus rutilus* (Cyprinidae, Teleostei). A qualitative and quantitative study on the development of sensory brain areas, Brain Behav. Evol. 34 (1989) 35–42.

[10] D.W. Brann, K. Dhandapani, C. Wakade, V.B. Mahesh, M.M. Khan, Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications, Steroids 72 (2007) 381–405.

[11] S.E. Bulun, K. Takayama, T. Suzuki, H. Sasano, B. Yilmaz, S. Sebastian, Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene, Semin. Reprod. Med. 22 (2004) 5–9.

[12] G.V. Callard, Z. Petro, K.J. Ryan, Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system, Endocrinology 103 (1978) 2283–2290.

[13] G.V. Callard, A.V. Tchoudakova, M. Kishida, E. Wood, Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 79 (2001) 305–314.

[14] K. Cheshenko, F. Pakdel, H. Segner, O. Kah, R.I. Eggen, Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish, Gen. Comp. Endocrinol. (2007).

[15] E.F. Chiang, Y.L. Yan, S.K. Tong, P.H. Hsiao, Y. Guiguen, J. Postlethwait, B.C. Chung, Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes, J. Exp. Zool. 290 (2001) 709–714.
[16] P. Ekström, C.M. Johnsson, L.M. Ohlin, Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones, J. Comp. Neurol. 436 (2001) 92–110.
[17] L. Fester, V. Ribeiro-Gouveia, J. Prange-Kiel, C. von Schassen, M. Bottner, H. Jarry, G.M. Rune, Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis, J. Neurochem. 97 (2006) 1136–1144.
[18] P.M. Forlano, D.L. Deitcher, D.A. Myers, A.H. Bass, Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source, J. Neurosci. 21 (2001) 8943–8955.
[19] P.M. Forlano, B.A. Schlinger, A.H. Bass, Brain aromatase: new lessons from non-mammalian model systems, Front. Neuroendocrinol. 27 (2006) 247–274.
[20] C.D. Fowler, F. Johnson, Z. Wang, Estrogen regulation of cell proliferation and distribution of estrogen receptor-alpha in the brains of adult female prairie and meadow voles, J. Comp. Neurol. 489 (2005) 166–179.
[21] L.A. Galea, M.D. Spritzer, J.M. Barker, J.L. Pawluski, Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult, Hippocampus 16 (2006) 225–232.
[22] L.M. Garcia-Segura, I. Azcoitia, L.L. DonCarlos, Neuroprotection by estradiol, Prog. Neurobiol. 63 (2001) 29–60.
[23] L.M. Garcia-Segura, S. Veiga, A. Sierra, R.C. Melcangi, I. Azcoitia, Aromatase: a neuroprotective enzyme, Prog. Neurobiol. 71 (2003) 31–41.
[24] A. Gonzalez, F. Piferrer, Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes, J. Exp. Zool. 293 (2002) 500–510.
[25] M. Götz, Glial cells generate neurons-master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells, Neuroscientist 9 (2003) 379–397.
[26] M. Götz, Y.A. Barde, Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons, Neuron 46 (2005) 369–372.
[27] H. Grandel, J. Kaslin, J. Ganz, I. Wenzel, M. Brand, Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate, Dev. Biol. 295 (2006) 263–277.
[28] Y. Hojo, T.A. Hattori, T. Enami, A. Furukawa, K. Suzuki, H.T. Ishii, H. Mukai, J.H. Morrison, W.G. Janssen, S. Kominami, N. Harada, T. Kimoto, S. Kawato, Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101 (2004) 865–870.
[29] R. Jagasia, H. Song, F.H. Gage, D.C. Lie, New regulators in adult neurogenesis and their potential role for repair, Trends Mol. Med. 12 (2006) 400–405.
[30] K. Jin, X. Wang, L. Xie, X.O. Mao, W. Zhu, Y. Wang, J. Shen, Y. Mao, S. Banwait, D.A. Greenberg, Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103 (2006) 13198–13202.
[31] M.S. Kaplan, J.W. Hinds, Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs, Science 197 (1977) 1092–1094.
[32] Y. Kazeto, S. Ijiri, A.R. Place, Y. Zohar, J.M. Trant, The 5′-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish, Biochem. Biophys. Res. Commun. 288 (2001) 503–508.
[33] Y. Kazeto, A.R. Place, J.M. Trant, Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles, Aquat. Toxicol. 69 (2004) 25–34.
[34] W. Kirsche, On postembryonic matrix zones in the brain of various vertebrates and their relationship to the study of the brain structure, Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 77 (1967) 313–406.
[35] M. Kishida, M. McLellan, J.A. Miranda, G.V. Callard, Estrogen and xenoestrogens up-regulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*), Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 129 (2001) 261–268.
[36] D. Kranz, W. Richter, Autoradiographic studies on the localization of the matrix zones of the diencephalon of young and adult *Lebistes reticulatus* (Teleostae), Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 82 (1970) 42–66.
[37] D. Kranz, W. Richter, Autoradiographic studies on the synthesis of DNA in the cerebellum and medulla oblongata of teleosts of various ages, Z. Mikrosk. Anat. Forsch. 82 (1970) 264–292.
[38] Y. Le Page, M. Scholze, O. Kah, F. Pakdel, Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system, Environ. Health Perspect. 114 (2006) 752–758.
[39] R.R. Leker, F. Soldner, I. Velasco, D.K. Gavin, A. Androutsellis-Theotokis, R.D. McKay, Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex, Stroke 38 (2007) 153–161.
[40] E.D. Lephart, A review of brain aromatase cytochrome P450, Brain Res. Brain Res. Rev. 22 (1996) 1–26.
[41] B.W. Lindsey, V. Tropepe, A comparative framework for understanding the biological principles of adult neurogenesis, Prog. Neurobiol. 80 (2006) 281–307.
[42] P.M. Lledo, M. Alonso, M.S. Grubb, Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits, Nat. Rev. Neurosci. 7 (2006) 179–193.
[43] S.E. London, B.A. Schlinger, Steroidogenic enzymes along the ventricular proliferative zone in the developing songbird brain, J. Comp. Neurol. 502 (2007) 507–521.
[44] K.E. Marsh, L.M. Creutz, M.B. Hawkins, J. Godwin, Aromatase immunoreactivity in the bluehead wrasse brain, Thalassoma bifasciatum: immunolocalization and co-regionalization with arginine vasotocin and tyrosine hydroxylase, Brain Res. 1126 (2006) 91–101.
[45] V. Martinez-Cerdeno, S.C. Noctor, A.R. Kriegstein, Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex, Eur. J. Neurosci. 24 (2006) 3475–3488.
[46] C.A. Mazzucco, S.E. Lieblich, B.I. Bingham, M.A. Williamson, V. Viau, L.A. Galea, Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats, Neuroscience 141 (2006) 1793–1800.
[47] M.M. McCarthy, Molecular aspects of sexual differentiation of the rodent brain, Psychoneuroendocrinology 19 (1994) 415–427.
[48] A. Menuet, I. Anglade, R. Le Guevel, E. Pellegrini, F. Pakdel, O. Kah, Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: comparison with estrogen receptor alpha, J. Comp. Neurol. 462 (2003) 180–193.
[49] A. Menuet, E. Pellegrini, I. Anglade, O. Blaise, V. Laudet, O. Kah, F. Pakdel, Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions, Biol. Reprod. 66 (2002) 1881–1892.
[50] A. Menuet, E. Pellegrini, F. Brion, M.M. Gueguen, I. Anglade, F. Pakdel, O. Kah, Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene, J. Comp. Neurol. 485 (2005) 304–320.
[51] J. Ninkovic, M. Götz, Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks, Curr. Opin. Neurobiol. (2007).
[52] S.C. Noctor, A.C. Flint, T.A. Weissman, W.S. Wong, B.K. Clinton, A.R. Kriegstein, Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia, J. Neurosci. 22 (2002) 3161–3173.
[53] S.C. Noctor, V. Martinez-Cerdeno, L. Ivic, A.R. Kriegstein, Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases, Nat. Neurosci. 7 (2004) 136–144.
[54] M. Pasmanik, G.V. Callard, Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland, Gen. Comp. Endocrinol. 60 (1985) 244–251.
[55] E. Pellegrini, A. Menuet, C. Lethimonier, F. Adrio, M.M. Gueguen, C. Tascon, I. Anglade, F. Pakdel, O. Kah, Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish, Gen. Comp. Endocrinol. 142 (2005) 60–66.
[56] E. Pellegrini, K. Mouriec, I. Anglade, A. Menuet, Y. Le Page, M.M. Gueguen, M.H. Marmignon, F. Brion, F. Pakdel, O. Kah, Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish, J. Comp. Neurol. 501 (2007) 150–167.
[57] R.S. Peterson, D.W. Lee, G. Fernando, B.A. Schlinger, Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain, J. Comp. Neurol. 475 (2004) 261–269.

[58] R.S. Peterson, C.J. Saldanha, B.A. Schlinger, Rapid up-regulation of aromatase mRNA and protein following neural injury in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*), J. Neuroendocrinol. 13 (2001) 317–323.

[59] P. Rakic, Neuronal migration and contact guidance in the primate telencephalon, Postgrad. Med. J. 54 (Suppl. 1) (1978) 25–40.

[60] S. Rastogi, D.A. Liberles, Subfunctionalization of duplicated genes as a transition state to neofunctionalization, BMC Evol. Biol. 5 (2005) 28.

[61] F. Saravia, Y. Revsin, V. Lux-Lantos, J. Beauquis, F. Homo-Delarche, A.F. De Nicola, Oestradiol restores cell proliferation in dentate gyrus and subventricular zone of streptozotocin-diabetic mice, J. Neuroendocrinol. 16 (2004) 704–710.

[62] F.E. Saravia, J. Beauquis, Y. Revsin, F. Homo-Delarche, E.R. de Kloet, A.F. De Nicola, Hippocampal neuropathology of diabetes mellitus is relieved by estrogen treatment, Cell. Mol. Neurobiol. 26 (2006) 943–957.

[63] P.H. Strobl-Mazzulla, N.P. Moncaut, G.C. Lopez, L.A. Miranda, A.V. Canario, G.M. Somoza, Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization, Gen. Comp. Endocrinol. 143 (2005) 21–32.

[64] S. Suzuki, C.M. Brown, P.M. Wise, Mechanisms of neuroprotection by estrogen, Endocrine 29 (2006) 209–215.

[65] S. Suzuki, L.M. Gerhold, M. Bottner, S.W. Rau, C. Dela Cruz, E. Yang, H. Zhu, J. Yu, A.B. Cashion, M.S. Kindy, I. Merchenthaler, F.H. Gage, P.M. Wise, Estradiol enhances neurogenesis following ischemic stroke through estrogen receptors alpha and beta, J. Comp. Neurol. 500 (2007) 1064–1075.

[66] A. Tchoudakova, G.V. Callard, Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary, Endocrinology 139 (1998) 2179–2189.

[67] R.J. Timmers, J.G. Lambert, J. Peute, H.G. Vullings, P.G. van Oordt, Localization of aromatase in the brain of the male African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by microdissection and biochemical identification, J. Comp. Neurol. 258 (1987) 368–377.

[68] S.K. Tong, B.C. Chung, Analysis of zebrafish cyp19 promoters, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 86 (2003) 381–386.

[69] C.D. Toran-Allerand, Minireview: a plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? Endocrinology 145 (2004) 1069–1074.

[70] C. Wiltrout, B. Lang, Y. Yan, R.J. Dempsey, R. Vemuganti, Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis, Neurochem. Int. (2007).

[71] J.G. Yague, A. Munoz, P. de Monasterio-Schrader, J. Defelipe, L.M. Garcia-Segura, I. Azcoitia, Aromatase expression in the human temporal cortex, Neuroscience 138 (2006) 389–401.

[72] C. Zhao, R. Fujinaga, M. Tanaka, A. Yanai, K. Nakahama, K. Shinoda, Region-specific expression and sex-steroidal regulation on aromatase and its mRNA in the male rat brain: immunohistochemical and in situ hybridization analyses, J. Comp. Neurol. 500 (2007) 557–573.

[73] G.K. Zupanc, K. Hinsch, F.H. Gage, Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain, J. Comp. Neurol. 488 (2005) 290–319.

III-2 Régulation de l'aromatase dans les astrocytes après lésion chez les mammifères et oiseaux ?

Il ressort de nos données et des travaux précédents du laboratoire que la régulation de l'aromatase par les stéroïdes a lieu exclusivement dans les cellules gliales radiaires, ce qui suggère la participation obligatoire d'un facteur présent dans ces cellules (Le Page *et al*., 2008; Le Page *et al*., 2006; Menuet *et al*., 2005). Or, fait intéressant et troublant, chez les mammifères, après lésion cérébrale, l'aromatase qui est normalement exprimée dans les neurones, est exprimée dans les astrocytes (Garcia-Segura *et al*., 1999a; Garcia-Segura *et al*., 1999b), alors qu'en conditions physiologiques, l'aromatase est majoritairement exprimée dans les neurones. Il en est de même chez les oiseaux, chez lesquels une forte expression d'aromatase au niveau des astrocytes fait suite à une lésion (Peterson *et al*., 2007; Walters and Saldanha, 2008; Wynne *et al*., 2008b). Cette expression *de novo* diminue l'apoptose et la taille de la lésion chez les oiseaux. Ces effets neuroprotecteurs étant réduits par une injection d'inhibiteur d'aromatase suivant la lésion, l'expression de l'aromatase est donc bien régulée après lésion (Wynne *et al*., 2008b). Les mécanismes sous-jacents à cette régulation sont inconnus. Néanmoins**,** les séquences des ARNm codant l'aromatase dans les neurones et astrocytes sont identiques, illustrant donc une transcription à partir d'un même promoteur. Ceci suggère donc qu'un facteur glial spécifique, exprimé dans les astrocytes en cas de lésion, serait impliqué dans l'expression de l'aromatase (Wynne *et al*., 2008a). Il est intéressant de constater que, chez les mammifères, les astrocytes dérivent de cellules gliales radiaires et sont les cellules progénitrices neuronales chez les adultes. Par ailleurs, il est connu que les astrocytes peuvent sous certaines conditions se dédifférencier en cellules gliales radiaires, lesquelles peuvent alors se diviser et donner des neurones. Ce mécanisme, bien documenté *in vitro* (Sharif *et al*., 2007) mériterait très certainement d'être étudié en détail *in vivo*. Ces mécanismes d'expression et de régulation de l'aromatase dans les astrocytes de mammifères en cas de lésion pourraient en effet impliquer un facteur similaire à celui présent dans les cellules radiaires de poisson.

III.3 Aromatase et « sexualisation » du cerveau

Nos études se sont focalisées sur le cerveau antérieur, qui inclut l'aire préoptique et l'hypothalamus, deux régions neuroendocrines. L'expression de l'aromatase B apparaît tôt pendant le développement embryo-larvaire et augmente de manière progressive (*cf*. **Résultats chapitre 2**) jusqu'à l'âge adulte (Gonzalez and Piferrer, 2003). Au contraire chez les mammifères, l'aromatase est fortement exprimée pendant le développement embryonnaire et

son expression décline jusqu'à l'âge adulte (Lephart, 1996). Cette expression embryonnaire restreinte de l'aromatase correspond à la période à laquelle le dimorphisme sexuel de certaines structures cérébrales, comme l'aire préoptique, apparaît ; cette sexualisation du cerveau étant irréversible (McCarthy *et al*., 2002). Ces observations peuvent donc suggérer l'existence chez les poissons d'un lien entre l'expression de l'aromatase et le dimorphisme sexuel de certaines régions cérébrale et la différenciation sexuelle. Chez les mammifères, le déterminisme du sexe, femelle par défaut, est placé sous un contrôle génétique, le facteur SRY ayant un rôle fondamental dans la masculinisation de la gonade. Au contraire, chez les poissons, le déterminisme génétique du sexe est faible, excepté chez le medaka (Schartl, 2004). Par exemple, le poisson zèbre est un hermaphrodite juvénile, possédant des gonades bipotentielles jusqu'à un stade avancé. Peu d'informations existent sur les mécanismes sous-jacents à la différenciation sexuelle du poisson zèbre et notamment au niveau de l'implication de l'aromatase dans l'établissement d'un dimorphisme sexuel du cerveau, comme observé chez les mammifères. Les quelques données de la littérature sont, de plus, controversées. Des expériences d'immunohistochimie et de PCR en temps réel ont par exemple montré que l'expression et la localisation de l'enzyme aromatase ne différaient pas significativement entre les mâles (Kallivretaki *et al*., 2007). Cependant, dans une autre étude, des expériences de PCR en temps réel ont montré que les quantités de messagers aromatase B différaient d'une population d'animaux exprimant très fortement l'aromatase et une autre l'exprimant beaucoup moins. Ces observations ont également montré que la différence d'expression des messagers aromatase entre ces deux populations commençait juste au moment de la différenciation sexuelle chez le poisson zèbre (Trant *et al*., 2001). Ces dernières données semblent donc suggérer que, comme chez les mammifères, l'établissement d'un dimorphisme sexuel cérébral pourrait impliquer l'aromatase chez le poisson zèbre.

De plus, le sexe phénotypique du poisson zèbre est réversible, en fonction de facteurs environnementaux ou sociaux. L'environnement stéroïdien est par exemple un facteur important intervenant dans le changement de sexe : une injection de 17α-méthyltestostérone entraîne une masculinisation de la gonade (Lee *et al*., 2003; Piferrer *et al*., 1993). Les poissons ont également la capacité de changer leur comportement sexuel de mâle à femelle ou inversement sous l'influence de facteurs environnementaux, sociaux (présence de congénères dominants) ou hormonaux, notamment après injection d'androgènes (Kobayashi and Nakanishi, 1999; Stacey and Kobayashi, 1996). Par exemple, chez de nombreux poissons coralliens, la mort d'un mâle dominant vivant avec plusieurs femelles entraîne une

masculinisation de la femelle dominante. De même, la maturation sexuelle des poissons juvéniles va dépendre du sexe des partenaires présents dans la population (Hobbs *et al*., 2004). Chez le poisson zèbre, une augmentation de la température de l'eau entraîne une masculinisation de tous les poissons zèbre femelles (Uchida *et al*., 2004). Ces exemples suggèrent donc l'existence d'une très forte « plasticité sexuelle du cerveau », montrant que les poissons possèdent tout au long de la vie la possibilité d'adapter le « sexe de leur cerveau au sexe de leur gonade ».

Il n'est pas exclu qu'une neurogènèse continue, contrôlée par les niveaux de stéroïdes circulants, puisse sous-tendre cette plasticité. En effet, il a été montré chez la daurade royale, une espèce hermaphrodite protandrique, que l'activité prolifération dans la région ventriculaire de l'aire dorsale de l'hypothalamus présente des différences significatives lors des différentes étapes du changement de sexe (Zikopoulos *et al*., 2000). Cette étude suggère donc l'existence d'un lien entre le dimorphisme sexuel de certaines régions cérébrales et des processus de neurogénèse, tout au moins en terme de prolifération.

Au vu de ces différentes données, il semblerait intéressant d'étudier par RT-PCR en temps réel le profil d'expression de l'aromatase B pendant le développement du poisson zèbre (pré et post-différenciation sexuelle, *i.e*. entre 14 et 30 jours) et chez des adultes traités avec des stéroïdes. Ce dernier point permettrait notamment de caractériser l'existence d'une différence d'expression de l'aromatase chez les adultes des deux sexes, en réponse à un tel traitement hormonal. En parallèle, la réalisation d'expériences d'immunohistochimie avec différents marqueurs (de prolifération, de cellules gliales radiaires et de neurones) permettrait de caractériser l'état de prolifération cellulaire et de différenciation neuronale pendant la différenciation sexuelle et chez les adultes traités avec des stéroïdes. Complétées par des analyses « morphologiques » des gonades en réponse aux traitements stéroïdiens, ces différentes expériences devraient permettre d'établir l'existence, ou non, d'un lien entre aromatase B, processus de neurogénèse et différenciation sexuelle.

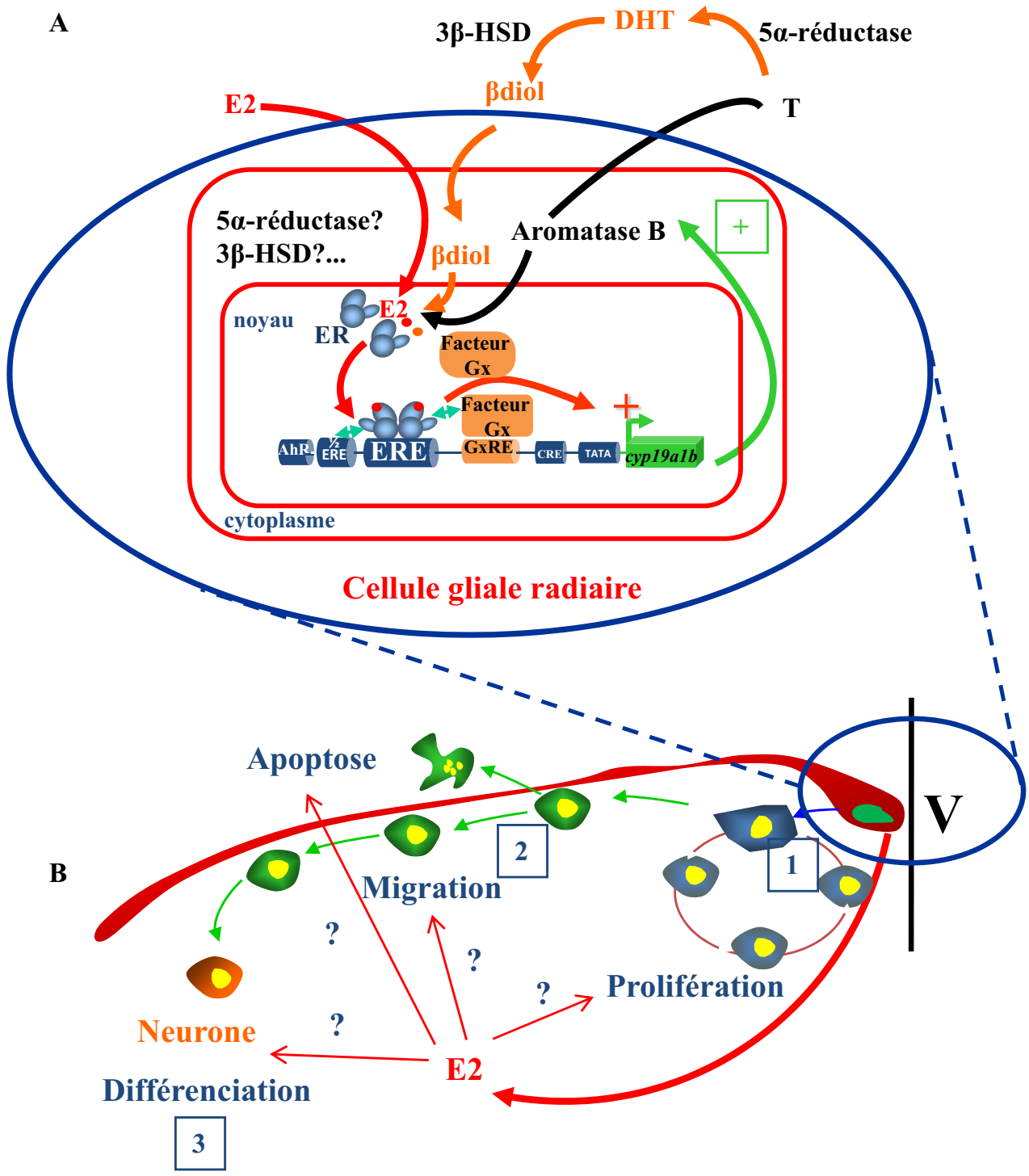


Figure 24 : Représentation schématique des rôles potentiels de l'E2 dans les processus de neurogénèse.

(A) Régulation du gène *cyp19a1b* par les stéroïdes sexuels dans les cellules gliales radiaires

(B) Rôle des cellules gliales radiaires dans les processus de neurogénèse: elles se divisent pour générer de nouvelles cellules (1) qui vont migrer le long des prolongements radiaires (2) et se différencier en neurones (3).

V : ventricule, AhR: site de liaison pour le « aryl hydrocarbon receptor »; CRE : « cyclic AMP response element »; E2 : œstradiol; ERE: élément de réponse aux œstrogènes; T : testostérone; DHT : dihydrotestostérone, TATA : boîte TATA, site de recrutement pour la machinerie de transcription.

IV. Conclusion générale

Les résultats obtenus au cours de cette thèse et résumés sur la figure 24, ont montré d'une part que le gène *cyp19a1b* est non seulement induit par l'E2 mais également par des androgènes, aromatisables et non aromatisables. Cette forte régulation implique la présence des zfERs, et est spécifique des cellules gliales (**Figure 24A**). L'identification du facteur glial assurant cette régulation œstrogénique cellule-dépendante est certainement un des axes de recherche principaux à développer. D'autre part, nous avons montré que les cellules gliales radiaires aromatase B-positives sont des cellules progénitrices (**Figure 24B**). L'ensemble de ces résultats, confrontés aux données de la littérature et aux processus connus de la neurogenèse chez les mammifères, suggère fortement que l'E2 intervient dans la modulation des processus de neurogenèse adulte chez les poissons. Et malgré les différences apparentes entre poissons et mammifères, il semble que de nombreux points communs émergent qui permettent de penser que le lien fonctionnel entre neurogénèse, aromatase et cellules gliales radiaires observé chez les poissons n'est en fait que l'utilisation à des fins adaptatives d'un mécanisme beaucoup plus général. A cet égard, le fait que l'aromatase vienne d'être visualisée dans la glie radiaire au cours du développement cortical chez la souris est parfaitement significatif (Martinez-Cerdeno *et al*., 2006).

Références bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdelgadir, S. E., Resko, J. A., Ojeda, S. R., Lephart, E. D., McPhaul, M. J., and Roselli, C. E. (1994). Androgens regulate aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid in rat brain. Endocrinology *135*, 395-401.

Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C. S., Topp, S., Tannhauser, B., Strahle, U., Gotz, M., and Bally-Cuif, L. (2006). Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. Dev Biol *295*, 278-293.

Akimoto, J., Itoh, H., Miwa, T., and Ikeda, K. (1993). Immunohistochemical study of glutamine synthetase expression in early glial development. Brain Res Dev Brain Res *72*, 9-14.

Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. J Comp Neurol *136*, 269-293.

Altman, J., and Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol *124*, 319-335.

Alunni, A., Vaccari, S., Torcia, S., Meomartini, M. E., Nicotra, A., and Alfei, L. (2005). Characterization of glial fibrillary acidic protein and astroglial architecture in the brain of a continuously growing fish, the rainbow trout. Eur J Histochem *49*, 157-166.

Alvarez-Buylla, A. (1990). Mechanism of neurogenesis in adult avian brain. Experientia *46*, 948-955.

Alvarez-Buylla, A., and Garcia-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. J Neurosci *22*, 629-634.

Alvarez-Buylla, A., and Nottebohm, F. (1988). Migration of young neurons in adult avian brain. Nature *335*, 353-354.

Alvarez-Buylla, A., Seri, B., and Doetsch, F. (2002). Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. Brain Res Bull *57*, 751-758.

Alvarez-Buylla, A., Theelen, M., and Nottebohm, F. (1988). Mapping of radial glia and of a new cell type in adult canary brain. J Neurosci *8*, 2707-2712.

Amateau, S. K., and McCarthy, M. M. (2002). Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area. J Neuroendocrinol *14*, 904-910.

Anolik, J. H., Klinge, C. M., Brolly, C. L., Bambara, R. A., and Hilf, R. (1996). Stability of the ligand-estrogen receptor interaction depends on estrogen response element flanking sequences and cellular factors. J Steroid Biochem Mol Biol *59*, 413-429.

Anolik, J. H., Klinge, C. M., Hilf, R., and Bambara, R. A. (1995). Cooperative binding of estrogen receptor to DNA depends on spacing of binding sites, flanking sequence, and ligand. Biochemistry *34*, 2511-2520.

Anthony, T. E., Klein, C., Fishell, G., and Heintz, N. (2004). Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. Neuron *41*, 881-890.

Anton, E. S., Marchionni, M. A., Lee, K. F., and Rakic, P. (1997). Role of GGF/neuregulin signaling in interactions between migrating neurons and radial glia in the developing cerebral cortex. Development *124*, 3501-3510.

Arochena, M., Anadon, R., and Diaz-Regueira, S. M. (2004). Development of vimentin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in the brain of gray mullet (Chelon labrosus), an advanced teleost. J Comp Neurol *469*, 413-436.

Azcoitia, I., Sierra, A., and Garcia-Segura, L. M. (1999). Localization of estrogen receptor beta-immunoreactivity in astrocytes of the adult rat brain. Glia *26*, 260-267.

Azcoitia, I., Sierra, A., Veiga, S., Honda, S., Harada, N., and Garcia-Segura, L. M. (2001). Brain aromatase is neuroprotective. J Neurobiol *47*, 318-329.

Bakker, J., Honda, S., Harada, N., and Balthazart, J. (2004). Restoration of male sexual behavior by adult exogenous estrogens in male aromatase knockout mice. Horm Behav *46*, 1-10.

Balthazart, J., Baillien, M., Charlier, T. D., Cornil, C. A., and Ball, G. F. (2003). Multiple mechanisms control brain aromatase activity at the genomic and non-genomic level. J Steroid Biochem Mol Biol *86*, 367-379.

Balthazart, J., and Ball, G. F. (1998). New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). Trends Neurosci *21*, 243-249.

Balthazart, J., Evrard, L., and Surlemont, C. (1990). Effects of the nonsteroidal inhibitor R76713 on testosterone-induced sexual behavior in the Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). Horm Behav *24*, 510-531.

Balthazart, J., Foidart, A., Surlemont, C., Harada, N., and Naftolin, F. (1992a). Neuroanatomical specificity in the autoregulation of aromatase-immunoreactive neurons by androgens and estrogens: an immunocytochemical study. Brain Res *574*, 280-290.

Balthazart, J., Surlemont, C., and Harada, N. (1992b). Aromatase as a cellular marker of testosterone action in the preoptic area. Physiol Behav *51*, 395-409.

Baulieu, E. E. (1997). Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. Recent Prog Horm Res *52*, 1-32.

Baulieu, E. E., and Robel, P. (1990). Neurosteroids: a new brain function? J Steroid Biochem Mol Biol *37*, 395-403.

Beato, M., Herrlich, P., and Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. Cell *83*, 851-857.

Behl, C. (2002). Oestrogen as a neuroprotective hormone. Nat Rev Neurosci *3*, 433-442.

Bentivoglio, M., and Mazzarello, P. (1999). The history of radial glia. Brain Res Bull *49*, 305-315.

Bernardos, R. L., and Raymond, P. A. (2006). GFAP transgenic zebrafish. Gene Expr Patterns *6*, 1007-1013.

Blazquez, M., and Piferrer, F. (2004). Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (Dicentrarchus labrax). Mol Cell Endocrinol *219*, 83-94.

Bourguet, W., Germain, P., and Gronemeyer, H. (2000). Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. Trends Pharmacol Sci *21*, 381-388.

Bourguiba, S., Lambard, S., and Carreau, S. (2003). Steroids control the aromatase gene expression in purified germ cells from the adult male rat. J Mol Endocrinol *31*, 83-94.

Brailoiu, E., Dun, S. L., Brailoiu, G. C., Mizuo, K., Sklar, L. A., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., and Dun, N. J. (2007). Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. J Endocrinol *193*, 311-321.

Brandstatter, R., and Kotrschal, K. (1989). Life history of roach, Rutilus rutilus (Cyprinidae, Teleostei). A qualitative and quantitative study on the development of sensory brain areas. Brain Behav Evol *34*, 35-42.

Brandstatter, R., and Kotrschal, K. (1990). Brain growth patterns in four European cyprinid fish species (Cyprinidae, Teleostei): roach (Rutilus rutilus), bream (Abramis brama), common carp (Cyprinus carpio) and sabre carp (Pelecus cultratus). Brain Behav Evol *35*, 195-211.

Brannvall, K., Korhonen, L., and Lindholm, D. (2002). Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. Mol Cell Neurosci *21*, 512-520.

Bulun, S. E., Sebastian, S., Takayama, K., Suzuki, T., Sasano, H., and Shozu, M. (2003). The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. J Steroid Biochem Mol Biol *86*, 219-224.

Carreau, S. (2002). The testicular aromatase: from gene to physiological role. Reprod Biol *2*, 5-12.

Caton, R. E., Farnell, K. E., Chronister, R. B., White, L. E., Jr., and Marco, L. A. (1980). Regeneration of the forebrain of the Japanese carp, Cyprinus carpio: a Golgi analysis. J Hirnforsch *21*, 257-263.

Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C. C., and Nagahama, Y. (2005). Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Gen Comp Endocrinol *141*, 101-115.

Chenn, A., and McConnell, S. K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. Cell *82*, 631-641.

Chiang, E. F., Yan, Y. L., Guiguen, Y., Postlethwait, J., and Chung, B. (2001). Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. Mol Biol Evol *18*, 542-550.

Choi, C. Y., and Habibi, H. R. (2003). Molecular cloning of estrogen receptor alpha and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. Mol Cell Endocrinol *204*, 169-177.

Compagnone, N. A., and Mellon, S. H. (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. Front Neuroendocrinol *21*, 1-56.

Conley, A., Corbin, J., Smith, T., Hinshelwood, M., Liu, Z., and Simpson, E. (1997). Porcine aromatases: studies on tissue-specific, functionally distinct isozymes from a single gene? J Steroid Biochem Mol Biol *61*, 407-413.

Conley, A., and Hinshelwood, M. (2001). Mammalian aromatases. Reproduction *121*, 685-695.

Cornell, R. A., and Eisen, J. S. (2005). Notch in the pathway: the roles of Notch signaling in neural crest development. Semin Cell Dev Biol *16*, 663-672.

Couse, J. F., and Korach, K. S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? Endocr Rev *20*, 358-417.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell *97*, 703-716.

Dubal, D. B., Zhu, H., Yu, J., Rau, S. W., Shughrue, P. J., Merchenthaler, I., Kindy, M. S., and Wise, P. M. (2001). Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 1952-1957.

Dutta, S., Dietrich, J. E., Westerfield, M., and Varga, Z. M. (2008). Notch signaling regulates endocrine cell specification in the zebrafish anterior pituitary. Dev Biol *319*, 248-257.

Ekstrom, P., Johnsson, C. M., and Ohlin, L. M. (2001). Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. J Comp Neurol *436*, 92-110.

Estay, F., Diaz, A., Pedrazza, R., and Colihueque, N. (2003). Oogenesis and plasma levels of sex steroids in cultured females of brown trout (Salmo trutta linnaeus, 1758) in Chile. J Exp Zoolog A Comp Exp Biol *298*, 60-66.

Feng, L., and Heintz, N. (1995). Differentiating neurons activate transcription of the brain lipid-binding protein gene in radial glia through a novel regulatory element. Development *121*, 1719-1730.

Filardo, E. J., Quinn, J. A., Frackelton, A. R., Jr., and Bland, K. I. (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. Mol Endocrinol *16*, 70-84.

Fisher, S. K., and Lewis, G. P. (2003). Muller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data. Vision Res *43*, 887-897.

Forlano, P. M., and Bass, A. H. (2005). Steroid regulation of brain aromatase expression in glia: female preoptic and vocal motor nuclei. J Neurobiol *65*, 50-58.

Forlano, P. M., Deitcher, D. L., Myers, D. A., and Bass, A. H. (2001). Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. J Neurosci *21*, 8943-8955.

Frojdo, E. M., Westerlund, J., and Isomaa, B. (2002). Culturing and characterization of astrocytes isolated from juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol *133*, 17-28.

Funakoshi, T., Yanai, A., Shinoda, K., Kawano, M. M., and Mizukami, Y. (2006). G protein-coupled receptor 30 is an estrogen receptor in the plasma membrane. Biochem Biophys Res Commun *346*, 904-910.

Furukawa, A., Miyatake, A., Ohnishi, T., and Ichikawa, Y. (1998). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. J Neurochem *71*, 2231-2238.

Fusani, L., and Gahr, M. (2006). Hormonal influence on song structure and organization: the role of estrogen. Neuroscience *138*, 939-946.

Galea, L. A., Spritzer, M. D., Barker, J. M., and Pawluski, J. L. (2006). Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. Hippocampus *16*, 225-232.

Garcia-Ovejero, D., Veiga, S., Garcia-Segura, L. M., and Doncarlos, L. L. (2002). Glial expression of estrogen and androgen receptors after rat brain injury. J Comp Neurol *450*, 256-271.

Garcia-Segura, L. M., Naftolin, F., Hutchison, J. B., Azcoitia, I., and Chowen, J. A. (1999a). Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. J Neurobiol *40*, 574-584.

Garcia-Segura, L. M., Wozniak, A., Azcoitia, I., Rodriguez, J. R., Hutchison, R. E., and Hutchison, J. B. (1999b). Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. Neuroscience *89*, 567-578.

Gelinas, D., Pitoc, G. A., and Callard, G. V. (1998). Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. Mol Cell Endocrinol *138*, 81-93.

Genissel, C., Levallet, J., and Carreau, S. (2001). Regulation of cytochrome P450 aromatase gene expression in adult rat Leydig cells: comparison with estradiol production. J Endocrinol *168*, 95-105.

Germain, P., Staels, B., Dacquet, C., Spedding, M., and Laudet, V. (2006). Overview of nomenclature of nuclear receptors. Pharmacol Rev *58*, 685-704.

Goldman, S. A., and Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. Proc Natl Acad Sci U S A *80*, 2390-2394.

Goldman, S. A., Zukhar, A., Barami, K., Mikawa, T., and Niedzwiecki, D. (1996). Ependymal/subependymal zone cells of postnatal and adult songbird brain generate both neurons and nonneuronal siblings *in vitro* and *in vivo*. J Neurobiol *30*, 505-520.

Gonzalez, A., and Piferrer, F. (2002). Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. J Exp Zool *293*, 500-510.

Gonzalez, A., and Piferrer, F. (2003). Aromatase activity in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. Gen Comp Endocrinol *132*, 223-230.

Gotz, M., and Barde, Y. A. (2005). Radial glial cells defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. Neuron *46*, 369-372.

Gotz, M., and Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 777-788.

Gotz, M., Stoykova, A., and Gruss, P. (1998). Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. Neuron *21*, 1031-1044.

Graddy, L. G., Kowalski, A. A., Simmen, F. A., Davis, S. L., Baumgartner, W. W., and Simmen, R. C. (2000). Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes. J Steroid Biochem Mol Biol *73*, 49-57.

Hall, J. M., McDonnell, D. P., and Korach, K. S. (2002). Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. Mol Endocrinol *16*, 469-486.

Halm, S., Kwon, J. Y., Rand-Weaver, M., Sumpter, J. P., Pounds, N., Hutchinson, T. H., and Tyler, C. R. (2003). Cloning and gene expression of P450 17alpha-hydroxylase,17,20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow Pimephales promelas. Gen Comp Endocrinol *130*, 256-266.

Halm, S., Pounds, N., Maddix, S., Rand-Weaver, M., Sumpter, J. P., Hutchinson, T. H., and Tyler, C. R. (2002). Exposure to exogenous 17beta-oestradiol disrupts p450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol *60*, 285-299.

Hartfuss, E., Forster, E., Bock, H. H., Hack, M. A., Leprince, P., Luque, J. M., Herz, J., Frotscher, M., and Gotz, M. (2003). Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. Development *130*, 4597-4609.

Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., and Gotz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. Dev Biol *229*, 15-30.

Hatakeyama, J., and Kageyama, R. (2006). Notch1 expression is spatiotemporally correlated with neurogenesis and negatively regulated by Notch1-independent Hes genes in the developing nervous system. Cereb Cortex *16 Suppl 1*, i132-137.

Hatten, M. E. (1999). Central nervous system neuronal migration. Annu Rev Neurosci *22*, 511-539.

Hatten, M. E. (2002). New directions in neuronal migration. Science *297*, 1660-1663.

Hawkins, M. B., Godwin, J., Crews, D., and Thomas, P. (2005). The distributions of the duplicate oestrogen receptors ER-beta a and ER-beta b in the forebrain of the Atlantic croaker (Micropogonias undulatus): evidence for subfunctionalization after gene duplication. Proc Biol Sci *272*, 633-641.

Hawkins, M. B., and Thomas, P. (2004). The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ERbetaa are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. Endocrinology *145*, 2968-2977.

Hobbs, J. P., Munday, P. L., and Jones, G. P. (2004). Social induction of maturation and sex determination in a coral reef fish. Proc Biol Sci *271*, 2109-2114.

Hojo, Y., Hattori, T. A., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H. T., Mukai, H., Morrison, J. H., Janssen, W. G., Kominami, S.*, et al.* (2004). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 865-870.

Hutchison, J. B., Beyer, C., Green, S., and Wozniak, A. (1994). Brain formation of oestrogen in the mouse: sex dimorphism in aromatase development. J Steroid Biochem Mol Biol *49*, 407-415.

Huttner, W. B., and Kosodo, Y. (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. Curr Opin Cell Biol *17*, 648-657.

Jacobi, J. S., Martin, C., Nava, G., Jeziorski, M. C., Clapp, C., and Martinez de la Escalera, G. (2007). 17-Beta-estradiol directly regulates the expression of adrenergic receptors and kisspeptin/GPR54 system in GT1-7 GnRH neurons. Neuroendocrinology *86*, 260-269.

Kallivretaki, E., Eggen, R. I., Neuhauss, S. C., Kah, O., and Segner, H. (2007). The zebrafish, brain-specific, aromatase cyp19a2 is neither expressed nor distributed in a sexually dimorphic manner during sexual differentiation. Dev Dyn *236*, 3155-3166.

Kalman, M. (1998). Astroglial architecture of the carp (Cyprinus carpio) brain as revealed by immunohistochemical staining against glial fibrillary acidic protein (GFAP). Anat Embryol (Berl) *198*, 409-433.

Kaplan, M. S. (1981). Neurogenesis in the 3-month-old rat visual cortex. J Comp Neurol *195*, 323-338.

Kazeto, Y., Ijiri, S., Place, A. R., Zohar, Y., and Trant, J. M. (2001). The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. Biochem Biophys Res Commun *288*, 503-508.

Kime, D. E., and Dolben, I. P. (1985). Hormonal changes during induced ovulation of the carp, Cyprinus carpio. Gen Comp Endocrinol *58*, 137-149.

Kimoto, T., Tsurugizawa, T., Ohta, Y., Makino, J., Tamura, H., Hojo, Y., Takata, N., and Kawato, S. (2001). Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. Endocrinology *142*, 3578-3589.

Kishida, M., and Callard, G. V. (2001). Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (Danio rerio) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. Endocrinology *142*, 740-750.

Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., and Ryffel, G. U. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. Cell *46*, 1053-1061.

Klein-Hitpass, L., Schwerk, C., Kahmann, S., and Vassen, L. (1998). Targets of activated steroid hormone receptors: basal transcription factors and receptor interacting proteins. J Mol Med *76*, 490-496.

Klinge, C. M. (2000). Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. Steroids *65*, 227-251.

Klinge, C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. Nucleic Acids Res *29*, 2905-2919.

Klinge, C. M., Peale, F. V., Jr., Hilf, R., Bambara, R. A., and Zain, S. (1992). Cooperative estrogen receptor interaction with consensus or variant estrogen responsive elements *in vitro*. Cancer Res *52*, 1073-1081.

Kobayashi, M., and Nakanishi, T. (1999). 11-ketotestosterone induces male-type sexual behavior and gonadotropin secretion in gynogenetic crucian carp, Carassius auratus langsdorfii. Gen Comp Endocrinol *115*, 178-187.

Kranz, D., and Richter, W. (1970). [Autoradiographic studies on the localization of the matrix zones of the diencephalon of young and adult Lebistes reticulatus (Teleostae)]. Z Mikrosk Anat Forsch *82*, 42-66.

Kranz, V. D., and Richter, W. (1975). [Neurogenesis and regeneration in the brain of teleosts in relation to age. (Autoradiographic studies)]. Z Alternsforsch *30*, 371-382.

Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M., and Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. J Steroid Biochem Mol Biol *74*, 311-317.

Langub, M. C., Jr., and Watson, R. E., Jr. (1992). Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelia, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. Endocrinology *130*, 364-372.

Lansdorp, P. M. (2007). Immortal strands? Give me a break. Cell *129*, 1244-1247.

Le Page, Y., Menuet, A., Kah, O., and Pakdel, F. (2008). Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. Mol Reprod Dev.

Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., and Pakdel, F. (2006). Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. Environ Health Perspect *114*, 752-758.

Lee, W. K., Lee, K. W., Kwak, E. J., Yang, S. W., Yang, K. S., Park, J. C., Joo, H. S., Lee, W. J., and Lee, W. B. (2003). Effects of environmental endocrine disruptors on the sex differentiation in Korean rockfish, Sebastes schlegeli. Water Sci Technol *47*, 65-70.

Lephart, E. D. (1996). A review of brain aromatase cytochrome P450. Brain Res Brain Res Rev *22*, 1-26.

Lin, C. Y., Vega, V. B., Thomsen, J. S., Zhang, T., Kong, S. L., Xie, M., Chiu, K. P., Lipovich, L., Barnett, D. H., Stossi, F.*, et al.* (2007). Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. PLoS Genet *3*, e87.

Liu, M., Hurn, P. D., Roselli, C. E., and Alkayed, N. J. (2007). Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. J Cereb Blood Flow Metab *27*, 135-141.

London, S. E., Monks, D. A., Wade, J., and Schlinger, B. A. (2006). Widespread capacity for steroid synthesis in the avian brain and song system. Endocrinology *147*, 5975-5987.

London, S. E., and Schlinger, B. A. (2007). Steroidogenic enzymes along the ventricular proliferative zone in the developing songbird brain. J Comp Neurol *502*, 507-521.

Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., and Gotz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. Neuron *37*, 751-764.

Malatesta, P., Hartfuss, E., and Gotz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. Development *127*, 5253-5263.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R. M. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. Cell *83*, 835-839.

Marsh, K. E., Creutz, L. M., Hawkins, M. B., and Godwin, J. (2006). Aromatase immunoreactivity in the bluehead wrasse brain, Thalassoma bifasciatum: immunolocalization and co-regionalization with arginine vasotocin and tyrosine hydroxylase. Brain Res *1126*, 91-101.

Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S. C., and Kriegstein, A. R. (2006). Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. Eur J Neurosci *24*, 3475-3488.

Mathieu, M., Mensah-Nyagan, A. G., Vallarino, M., Do-Rego, J. L., Beaujean, D., Vaudry, D., Luu-The, V., Pelletier, G., and Vaudry, H. (2001). Immunohistochemical localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and 5 alpha-reductase in the brain of the African lungfish Protopterus annectens. J Comp Neurol *438*, 123-135.

Matsumoto, T., Honda, S., and Harada, N. (2003). Neurological effects of aromatase deficiency in the mouse. J Steroid Biochem Mol Biol *86*, 357-365.

McCarthy, M. M., Amateau, S. K., and Mong, J. A. (2002). Steroid modulation of astrocytes in the neonatal brain: implications for adult reproductive function. Biol Reprod *67*, 691-698.

McCullough, L. D., Blizzard, K., Simpson, E. R., Oz, O. K., and Hurn, P. D. (2003). Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. J Neurosci *23*, 8701-8705.

Melo, A. C., and Ramsdell, J. S. (2001). Sexual dimorphism of brain aromatase activity in medaka: induction of a female phenotype by estradiol. Environ Health Perspect *109*, 257-264.

Menuet, A., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F., and Kah, O. (2003). Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. J Comp Neurol *462*, 180-193.

Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., and Pakdel, F. (2002). Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding

characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. Biol Reprod *66*, 1881-1892.

Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M. M., Anglade, I., Pakdel, F., and Kah, O. (2005). Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. J Comp Neurol *485*, 304-320.

Merkle, F. T., Tramontin, A. D., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 17528-17532.

Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. Development *131*, 3133-3145.

Mori, T., Buffo, A., and Gotz, M. (2005). The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. Curr Top Dev Biol *69*, 67-99.

Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett *392*, 49-53.

Mueller, T., and Wullimann, M. F. (2003). Anatomy of neurogenesis in the early zebrafish brain. Brain Res Dev Brain Res *140*, 137-155.

Naftolin, F., Ryan, K. J., and Petro, Z. (1971). Aromatization of androstenedione by the diencephalon. J Clin Endocrinol Metab *33*, 368-370.

Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Dammerman, R. S., and Kriegstein, A. R. (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. Nature *409*, 714-720.

Noctor, S. C., Flint, A. C., Weissman, T. A., Wong, W. S., Clinton, B. K., and Kriegstein, A. R. (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. J Neurosci *22*, 3161-3173.

Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., and Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. Nat Neurosci *7*, 136-144.

Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., and Kriegstein, A. R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. J Comp Neurol *508*, 28-44.

Onteniente, B., Kimura, H., and Maeda, T. (1983). Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. J Comp Neurol *215*, 427-436.

Ormerod, B. K., Lee, T. T., and Galea, L. A. (2003). Estradiol initially enhances but subsequently suppresses (via adrenal steroids) granule cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. J Neurobiol *55*, 247-260.

Ormerod, B. K., Lee, T. T., and Galea, L. A. (2004). Estradiol enhances neurogenesis in the dentate gyri of adult male meadow voles by increasing the survival of young granule neurons. Neuroscience *128*, 645-654.

Pang, Y., Dong, J., and Thomas, P. (2008). Estrogen signaling characteristics of Atlantic croaker G protein-coupled receptor 30 (GPR30) and evidence it is involved in maintenance of oocyte meiotic arrest. Endocrinology *149*, 3410-3426.

Pasmanik, M., and Callard, G. V. (1985). Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. Gen Comp Endocrinol *60*, 244-251.

Pasmanik, M., and Callard, G. V. (1988). Changes in brain aromatase and 5 alpha-reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (Carassius auratus). Endocrinology *122*, 1349-1356.

Pasmanik, M., Schlinger, B. A., and Callard, G. V. (1988). *In vivo* steroid regulation of aromatase and 5 alpha-reductase in goldfish brain and pituitary. Gen Comp Endocrinol *71*, 175-182.

Peters, G. A., and Khan, S. A. (1999). Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140. Mol Endocrinol *13*, 286-296.

Peterson, R. S., Fernando, G., Day, L., Allen, T. A., Chapleau, J. D., Menjivar, J., Schlinger, B. A., and Lee, D. W. (2007). Aromatase expression and cell proliferation following injury of the adult zebra finch hippocampus. Dev Neurobiol *67*, 1867-1878.

Peterson, R. S., Lee, D. W., Fernando, G., and Schlinger, B. A. (2004). Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. J Comp Neurol *475*, 261-269.

Peterson, R. S., Saldanha, C. J., and Schlinger, B. A. (2001). Rapid upregulation of aromatase mRNA and protein following neural injury in the zebra finch (Taeniopygia guttata). J Neuroendocrinol *13*, 317-323.

Peterson, R. S., Yarram, L., Schlinger, B. A., and Saldanha, C. J. (2005). Aromatase is pre-synaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. Proc Biol Sci *272*, 2089-2096.

Pfaff, D. W. (1968a). Autoradiographic localization of radioactivity in rat brain after injection of tritiated sex hormones. Science *161*, 1355-1356.

Pfaff, D. W. (1968b). Autoradiographic localization of testosterone-3H in the female rat brain and estradiol-3H in the male rat brain. Experientia *24*, 958-959.

Piferrer, F., Baker, I. J., and Donaldson, E. M. (1993). Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha). Gen Comp Endocrinol *91*, 59-65.

Pontious, A., Kowalczyk, T., Englund, C., and Hevner, R. F. (2008). Role of intermediate progenitor cells in cerebral cortex development. Dev Neurosci *30*, 24-32.

Potten, C. S., Owen, G., and Booth, D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. J Cell Sci *115*, 2381-2388.

Rakic, P. (2003). Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. Glia *43*, 19-32.

Reugels, A. M., Boggetti, B., Scheer, N., and Campos-Ortega, J. A. (2006). Asymmetric localization of Numb:EGFP in dividing neuroepithelial cells during neurulation in Danio rerio. Dev Dyn *235*, 934-948.

Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., and Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. Science *307*, 1625-1630.

Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H., and Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. J Cell Sci *116*, 585-586.

Robinson-Rechavi, M., Marchand, O., Escriva, H., Bardet, P. L., Zelus, D., Hughes, S., and Laudet, V. (2001). Euteleost fish genomes are characterized by expansion of gene families. Genome Res *11*, 781-788.

Roselli, C. E., and Resko, J. A. (1986). Effects of gonadectomy and androgen treatment on aromatase activity in the fetal monkey brain. Biol Reprod *35*, 106-112.

Roselli, C. E., and Resko, J. A. (1997). Sex differences in androgen-regulated expression of cytochrome P450 aromatase in the rat brain. J Steroid Biochem Mol Biol *61*, 365-374.

Roselli, C. F. (2007). Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection. J Steroid Biochem Mol Biol *106*, 143-150.

Rossi, D. J., Brady, J. D., and Mohr, C. (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. Nat Neurosci *10*, 1377-1386.

Sakamoto, H., Ukena, K., and Tsutsui, K. (2001). Activity and localization of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/ Delta5-Delta4-isomerase in the zebrafish central nervous system. J Comp Neurol *439*, 291-305.

Sancho-Tello, M., Valles, S., Montoliu, C., Renau-Piqueras, J., and Guerri, C. (1995). Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. Glia *15*, 157-166.

Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., Gustafsson, J. A., and Safe, S. (2000). Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. J Biol Chem *275*, 5379-5387.

Schartl, M. (2004). A comparative view on sex determination in medaka. Mech Dev *121*, 639-645.

Schlinger, B. A., Amur-Umarjee, S., Shen, P., Campagnoni, A. T., and Arnold, A. P. (1994). Neuronal and non-neuronal aromatase in primary cultures of developing zebra finch telencephalon. J Neurosci *14*, 7541-7552.

Schlinger, B. A., and London, S. E. (2006). Neurosteroids and the songbird model system. J Exp Zoolog A Comp Exp Biol *305*, 743-748.

Schnitzer, J., Franke, W. W., and Schachner, M. (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. J Cell Biol *90*, 435-447.

Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T., Rhodes, D., and Neuhaus, D. (1993). DNA recognition by the oestrogen receptor: from solution to the crystal. Structure *1*, 187-204.

Sharif, A., Legendre, P., Prevot, V., Allet, C., Romao, L., Studler, J. M., Chneiweiss, H., and Junier, M. P. (2007). Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. Oncogene *26*, 2695-2706.

Shen, Q., Zhong, W., Jan, Y. N., and Temple, S. (2002). Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts. Development *129*, 4843-4853.

Shughrue, P. J., Lane, M. V., and Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. J Comp Neurol *388*, 507-525.

Shughrue, P. J., Lane, M. V., Scrimo, P. J., and Merchenthaler, I. (1998). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. Steroids *63*, 498-504.

Simerly, R. B., Zee, M. C., Pendleton, J. W., Lubahn, D. B., and Korach, K. S. (1997). Estrogen receptor-dependent sexual differentiation of dopaminergic neurons in the preoptic region of the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 14077-14082.

Stacey, N., and Kobayashi, M. (1996). Androgen induction of male sexual behaviors in female goldfish. Horm Behav *30*, 434-445.

Strobl-Mazzulla, P. H., Moncaut, N. P., Lopez, G. C., Miranda, L. A., Canario, A. V., and Somoza, G. M. (2005). Brain aromatase from pejerrey fish (Odontesthes bonariensis): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. Gen Comp Endocrinol *143*, 21-32.

Tchoudakova, A., and Callard, G. V. (1998). Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. Endocrinology *139*, 2179-2189.

Timmers, R. J., Lambert, J. G., Peute, J., Vullings, H. G., and van Oordt, P. G. (1987). Localization of aromatase in the brain of the male African catfish, Clarias gariepinus (Burchell), by microdissection and biochemical identification. J Comp Neurol *258*, 368-377.

Tomy, S., Wu, G. C., Huang, H. R., Dufour, S., and Chang, C. F. (2007). Developmental expression of key steroidogenic enzymes in the brain of protandrous black porgy fish, Acanthopagrus schlegeli. J Neuroendocrinol *19*, 643-655.

Toran-Allerand, C. D., Guan, X., MacLusky, N. J., Horvath, T. L., Diano, S., Singh, M., Connolly, E. S., Jr., Nethrapalli, I. S., and Tinnikov, A. A. (2002). ER-X: a novel, plasma

membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. J Neurosci *22*, 8391-8401.

Toran-Allerand, C. D., Singh, M., and Setalo, G., Jr. (1999). Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. Front Neuroendocrinol *20*, 97-121.

Trant, J. M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B. C., and Place, A. R. (2001). Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (Danio rerio). J Exp Zool *290*, 475-483.

Trudeau, V. L., Peter, R. E., and Sloley, B. D. (1991). Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. Biol Reprod *44*, 951-960.

Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., and Iguchi, T. (2004). An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol *137*, 11-20.

Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Nakayama, H., and Doi, K. (2006). Cell cycle progression is required for nuclear migration of neural progenitor cells. Brain Res *1088*, 57-67.

Valle, L. D., Ramina, A., Vianello, S., Belvedere, P., and Colombo, L. (2002). Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum). J Steroid Biochem Mol Biol *82*, 19-32.

van Nes, S., Moe, M., and Andersen, O. (2005). Molecular characterization and expression of two cyp19 (P450 aromatase) genes in embryos, larvae, and adults of Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus). Mol Reprod Dev *72*, 437-449.

Veiga, S., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M. (2005). Extragonadal synthesis of estradiol is protective against kainic acid excitotoxic damage to the hippocampus. Neuroreport *16*, 1599-1603.

Vizziano, D., Randuineau, G., Baron, D., Cauty, C., and Guiguen, Y. (2007). Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Dev Dyn *236*, 2198-2206.

Volknandt, W. (2002). Vesicular release mechanisms in astrocytic signalling. Neurochem Int *41*, 301-306.

Walters, B. J., and Saldanha, C. J. (2008). Glial aromatization increases the expression of bone morphogenetic protein-2 in the injured zebra finch brain. J Neurochem *106*, 216-223.

Wang, L., Andersson, S., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2001). Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 2792-2796.

Wang, L., Andersson, S., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2003a). Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 703-708.

Wang, Y., and Ge, W. (2004). Cloning of zebrafish ovarian P450c17 (CYP17, 17alpha-hydroxylase/17, 20-lyase) and characterization of its expression in gonadal and extra-gonadal tissues. Gen Comp Endocrinol *135*, 241-249.

Wang, Z., Benoit, G., Liu, J., Prasad, S., Aarnisalo, P., Liu, X., Xu, H., Walker, N. P., and Perlmann, T. (2003b). Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. Nature *423*, 555-560.

Watson, J. T., and Adkins-Regan, E. (1989). Testosterone implanted in the preoptic area of male Japanese quail must be aromatized to activate copulation. Horm Behav *23*, 432-447.

Wehrenberg, U., Prange-Kiel, J., and Rune, G. M. (2001). Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. J Neurochem *76*, 1879-1886.

Wynne, R. D., Maas, S., and Saldanha, C. J. (2008a). Molecular characterization of the injury-induced aromatase transcript in the adult zebra finch brain. J Neurochem *105*, 1613-1624.

Wynne, R. D., and Saldanha, C. J. (2004). Glial aromatization decreases neural injury in the zebra finch (Taeniopygia guttata): influence on apoptosis. J Neuroendocrinol *16*, 676-683.

Wynne, R. D., Walters, B. J., Bailey, D. J., and Saldanha, C. J. (2008b). Inhibition of injury-induced glial aromatase reveals a wave of secondary degeneration in the songbird brain. Glia *56*, 97-105.

Xia, Z., Patino, R., Gale, W. L., Maule, A. G., and Densmore, L. D. (1999). Cloning, *in vitro* expression, and novel phylogenetic classification of a channel catfish estrogen receptor. Gen Comp Endocrinol *113*, 360-368.

Xiong, F., Liu, D., Le Drean, Y., Elsholtz, H. P., and Hew, C. L. (1994). Differential recruitment of steroid hormone response elements may dictate the expression of the pituitary gonadotropin II beta subunit gene during salmon maturation. Mol Endocrinol *8*, 782-793.

Yague, J. G., Lavaque, E., Carretero, J., Azcoitia, I., and Garcia-Segura, L. M. (2004). Aromatase, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, is expressed by human and rat glioblastomas. Neurosci Lett *368*, 279-284.

Yague, J. G., Munoz, A., de Monasterio-Schrader, P., Defelipe, J., Garcia-Segura, L. M., and Azcoitia, I. (2006). Aromatase expression in the human temporal cortex. Neuroscience *138*, 389-401.

Yamada, K., and Watanabe, M. (2002). Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. Anat Sci Int *77*, 94-108.

Zhang, D., and Trudeau, V. L. (2006). Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol *144*, 306-315.

Zhang, Z., Kumar, R., Santen, R. J., and Song, R. X. (2004). The role of adapter protein Shc in estrogen non-genomic action. Steroids *69*, 523-529.

Zhao, J., Mak, P., Tchoudakova, A., Callard, G., and Chen, S. (2001). Different catalytic properties and inhibitor responses of the goldfish brain and ovary aromatase isozymes. Gen Comp Endocrinol *123*, 180-191.

Zikopoulos, B., Kentouri, M., and Dermon, C. R. (2000). Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (Sparus aurata). Brain Behav Evol *56*, 310-322.

Zupanc, G. K. (2006). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol *192*, 649-670.

Zupanc, G. K., and Clint, S. C. (2003). Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. Glia *43*, 77-86.

Zupanc, G. K., and Horschke, I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. J Comp Neurol *353*, 213-233.

Karen MOURIEC

Régulation de l'aromatase B dans les cellules gliales radiaires dans le cerveau du poisson zèbre (*Danio rerio*) et rôles potentiels dans la neurogénèse adulte.

Résumé

Chez les mammifères, la neurogénèse adulte est limitée, au contraire, chez les poissons téléostéens, elle est intense et a lieu dans tout le cerveau. Chez les poissons, l'aromatase cérébrale (aroB), l'enzyme de synthèse de l'œstradiol (E2) est régulée par l'E2 dans les cellules gliales radiaires (CGR). Ces CGR dont le rôle est inconnu chez les poissons sont des cellules progénitrices chez les mammifères lors de l'embryogénèse. L'objectif de ce travail était d'étudier l'hypothèse d'un lien entre l'E2 et la forte activité neurogénique chez les poissons. Nous montrons que les CGR sont des cellules progénitrices chez le poisson zèbre adulte. Nous avons caractérisé une lignée de poisson zèbre transgénique aroB/GFP. Nous mettons en évidence que des androgènes peuvent réguler l'aroB, *via* les récepteurs aux œstrogènes (ERs). Enfin, nous montrons que les ARNm des ERs et de l'aroB apparaissent très tôt pendant le développement et que la signalisation œstrogénique se met en place entre 24h et 48h.

Mots clés: aromatase B, œstradiol, récepteurs aux œstrogènes, neurogénèse, cellules gliales radiaires, poisson zèbre

Résumé en anglais

Whilst adult neurogenesis is a limited process in mammals, it is, in contrast, intense in teleost fish and occurs in the whole brain. Fish exhibit specific features concerning the aromatase, the enzyme that synthesises estradiol (E2). Indeed, brain aromatase (aroB) is up-regulated by E2 in radial glial cells (RGC). These RGC are known progenitor cells in mammals, during embryonic neurogenesis. In contrast, their role is unknown in fish. The aim of this work was to study the potential link between E2 and the strong neurogenic activity of fish. We show that RGC are progenitor cells in the adult brain of zebrafish (*Danio rerio*). Moreover, we characterized and validated a transgenic zebrafish line aroB/GFP. We also found that aromatizable and non aromatizable androgens can induce aroB through estrogen receptors. We also show that the onset of the estrogen regulation of aroB appears between 24 and 48h.

Key words: aromatase B, estradiol, estrogen receptors, neurogenesis, radial glial cells, zebrafish.