
Analyse de la région du canal central de la moelle épinière et des neurones de contact du liquide céphalo-rachidien chez le macaque.

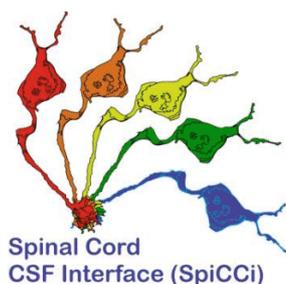
Institut des Neurosciences de la Timone à Marseille

Equipe SpiCCI dirigée par Monsieur Nicolas WANAUVERBECK

Stage sous la direction de Madame Anne KASTNER

Du 14-06-2021 au 17-07-2021

Par Alexandre LAINE



Je tiens tout d'abord à remercier Madame Anne KASTNER qui a pris le temps de m'accompagner et de partager avec moi son goût pour la recherche. Cette première expérience m'a enseigné par la pratique la réalité du métier d'enseignant-chercheur.

Je veux aussi remercier Monsieur Nicolas WANAVÉBECQ pour m'avoir accueilli dans son équipe, ainsi qu'Edith BLASCO et Priscille RIONDEL qui m'ont permis d'assister aux autres approches du sujet.

Table des matières

INTRODUCTION :	4
MATERIEL ET METHODES :	6
Immunohistochimie.....	6
Microscopie confocale	8
RESULTATS :	9
Fibres neuronales de la PEZ du macaque.....	9
La zone sub-épendymaire chez le marmoset.....	12
Lien entre les neurones de contact et des neurones cholinergiques.....	14
DISCUSSION :	15
Fibres neuronales de la PEZ du macaque.....	15
La zone sub-épendymaire chez le marmoset.....	15
Lien entre les neurones de contact et des neurones cholinergiques.....	16
CONCLUSION :	16
BIBLIOGRAPHIE :	17
ANNEXE :	18

INTRODUCTION :

Lors de ce stage de cinq semaines à l'Institut des Neurosciences de la Timone, j'ai intégré l'équipe SpiCCI dirigée par Nicolas WANAUVERBECK. Cette équipe, qui a pour sujet d'étude la moelle épinière et l'interface avec le liquide cérébro-spinal (LCS), se penche particulièrement sur une population de neurones que sont les neurones de contact du liquide cérébro-spinal (Nc-LCS). Elle suit pour cela différentes approches allant de l'électrophysiologie à l'immunohistochimie. J'ai eu la chance de suivre pendant cinq semaines Madame Anne KASTNER, enseignante-chercheuse, qui travaille sur l'approche immunohistochimique. Avant de présenter les différents objectifs de ce stage, je vais commencer par un état des lieux sur les connaissances actuelles du sujet.

Les Nc-LCS sont présents chez tous les vertébrés, mais leur rôle au sein du système nerveux central est encore peu connu. La moelle épinière présente, en son centre, un canal central (CC) délimité par une ceinture de cellules épendymaires formant la couche épendymaire. Celle-ci permet de faire passer le LCS dans le canal central tout en le brassant, par la présence de cils sur le pôle apical des cellules épendymaires.

Le LCS est formé, à partir du sang, par les plexus-choroïdes des ventricules cérébraux. Il a une composition semblable à celle du plasma tout en contenant moins de protéines et de glucose. Son rôle est de protéger l'encéphale et la moelle épinière contre les chocs, mais aussi de les nourrir et de transporter des messagers chimiques comme les hormones ou les neurotransmetteurs.

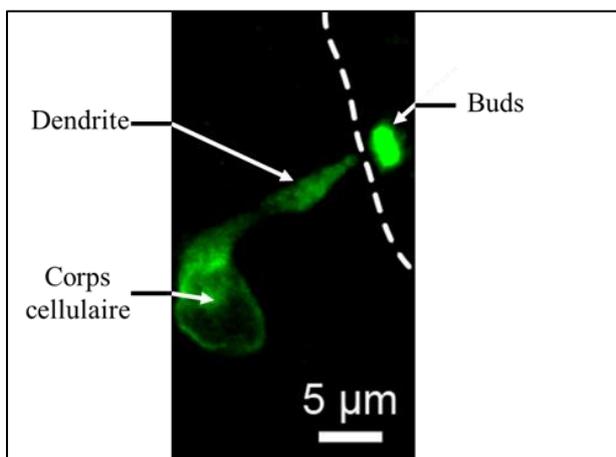


Figure : Structure d'un Nc-LCS de souris, visualisé au microscope confocal à fluorescence. (2014 Orts-Del'Immagine et al.)

Les Nc-LCS caractérisés chez la souris sont des neurones qui ont la particularité de présenter un prolongement dendritique traversant la ceinture épendymaire et se terminant par une protubérance ciliée appelée buds dans le CC (**Figure 1**). Le corps cellulaire, qui est l'origine de ce prolongement, réside soit dans la zone sub-épendymaire de la moelle épinière, soit est directement inséré dans la couche épendymaire.

Cette zone épendymaire est reconnue comme étant une région niche de cellules souches. Mais le niveau des connaissances sur le lien entre cette niche et les Nc-LCS est faible. Jusque-là, il s'avère que les Nc-LCS auraient un niveau de maturité bloqué à un stade intermédiaire, et migreraient au début de la vie pour s'éloigner du CC. Cette migration se couplerait d'une modification du phénotype des Nc-LCS.

Les Nc-LCS sont des neurones principalement GABAergiques, ce qui signifie qu'ils utilisent l'acide γ -aminobutyrique comme neurotransmetteur. Ils présentent des canaux PKD2L1, qui sont spécifiques à cette famille neuronale, et qui auraient une capacité de perception des variations mécaniques et chimiques du liquide cérébro-spinal.

La partie axonale des Nc-LCS est peu connue, mais son étude permettrait de comprendre les possibles échanges entre les Nc-LCS et le reste du système nerveux. Les premiers résultats du laboratoire chez les primates ont permis d'observer une zone péri-épendymaire (PEZ) qui se démarque par l'absence de la plupart des neurones, les Nc-LCS sont les seuls qui traversent cette zone. Cette PEZ est absente chez les rongeurs. La distance qui sépare leur corps cellulaire de la couche épendymaire varie le long de l'axe rostro-caudal en baissant lorsqu'on se déplace vers la partie caudale de la moelle épinière.

Afin de compléter ces données chez les primates, nous avons tout d'abord étudié les fibres neuronales des Nc-LCS ainsi que celles longeant le CC chez le macaque, puis nous avons cherché à caractériser les neurotransmetteurs au contact des Nc-LCS, enfin nous avons fait une analyse comparative de la PEZ chez le marmoset.

MATERIEL ET METHODES :

Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une partie de l'histologie se basant sur la réaction entre un antigène et un anticorps pour un marquage des protéines visées. Suite à cet assemblage entre antigène et anticorps il suffit d'ajouter un fluorophore ciblé à un anticorps afin de le rendre observable au microscope à fluorescence. Les anticorps qui sont utilisés dans le cadre du stage sont listés, ci-dessous, dans le **tableau 1**. Chaque anticorps primaire existe en plusieurs forme (Mouse, Goat, Rabbit) permettant par la suite le ciblage de chacun par un anticorps secondaire (anti-Mouse, anti-Goat, anti-Rabbit). Les anticorps primaires ont donc des noms sous la forme : Rabbit-anti-MAP2, alors que les anticorps secondaires sont sous la forme : Donkey-anti-Rabbit. Le DAPI fonctionne différemment, il doit être mis en contact avec les coupes pour permettre le marquage, car il s'agit d'un agent s'intercalant dans l'ADN.

ANTICORPS	PROTEINE CIBLE	INFORMATIONS
NF-H (NON PHOSPHORYLE)	Neurofilaments de poids moléculaire d'environ 200 kDa	Marqueur de maturité faible / intermédiaire. Marquage corps cellulaire, dendrites et axones.
NF-160	Neurofilaments de poids moléculaire d'environ 160 kDa	Marqueur de maturité intermédiaire. Marquage des axones.
B₃-TUBULINE	Neurones de contact	Marqueur de maturité faible Marquage corps cellulaire, axones et dendrites.
MAP-2	Neurones de contact	Marquage corps cellulaire et dendrites
CHAT	Acétyl-Choline	

Tableau 1 : récapitulatif des différents anticorps utilisés et des informations qu'ils peuvent nous apporter.

Une manipulation d'immunohistochimie se compose généralement des mêmes étapes, même si les temps d'incubation, les concentrations et les solutions utilisées peuvent varier en fonction du marquage réalisé. Après la récupération des coupes de moelle épinière de 30µm réalisées préalablement au cryostat, on commence par un rinçage au phosphate buffer saline (PBS). Puis on dépose dans les cuves une première solution, pendant environ 30min, contenant du triton (TX) à 0.3%, du bovine albumine sérum (BSA) à 1%, du sérum de chèvre normal (NGS) à 3% et du PBS pour compléter. Ces composés forment la solution de perméabilisation et de saturation. En effet, le TX est un détergeant qui va rendre perméable les membranes cellulaires, permettant l'entrée du BSA. Ce dernier va recouvrir tous les sites antigéniques afin d'éviter les couplages antigènes/anticorps non voulus. Ces deux étapes peuvent se faire en une seule car les deux solutions cohabitent sans problème.

Suite à cette première étape s'en suit un rinçage au PBS avant d'ajouter la solution du marquage primaire composé de NGS à 3%, d'anticorps primaires (Ac1) à 0.2% chacun et de PBS pour compléter. Il faut alors veiller à ce que les Ac1 soient bien d'origines différentes afin que le marquage secondaire se fasse sans problème. Afin d'analyser les fibres neuronales des Nc-LCS, nous avons utilisé un marquage anti- β_3 Tubuline couplé soit à un anti-NFH (lors de cette manipulation nous nous sommes retrouvés en manque de cet anticorps, nous n'avons pu mettre qu'environ 0,5 μ L au lieu des 2,5 μ L normalement prévus), soit à un anti-NF160. Pour la caractérisation des neurotransmetteurs, nous avons utilisé un marquage anti-ChAT (AB144P), assemblé à un anti-synaptophysine. Enfin, pour la comparaison des PEZ chez le macaque et le marmoset, nous avons réalisé un marquage anti-MAP2, parallèlement à un anti- β_3 Tubuline et à un anti-Vimentine. Cette étape de marquage primaire est incubée toute la nuit sous agitation à 4°C.

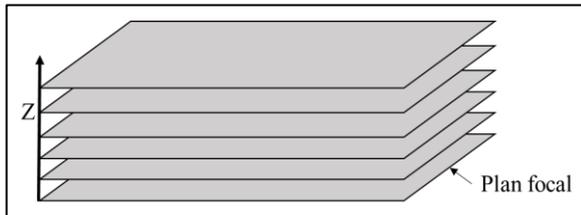
Nous poursuivons ce schéma type par un rinçage au PBS, suivi du marquage secondaire. On ajoute pour cela une solution composée d'anticorps secondaires (Ac2) à 0,5%, de NGS à 3% et de PBS pour compléter. On laisse incuber cette solution pendant 2h sous agitation à température ambiante mais en protégeant les puits par un papier aluminium, car les anticorps secondaires sont des fluorophores sensibles à la lumière.

Après un rinçage au PBS, l'étape suivante consiste à marquer la ceinture épendymaire par l'utilisation du DAPI, qui est un marqueur fluorescent de l'ADN. On ajoute donc une solution composée de DAPI et de PBS pendant environ 20min, puis on commence le montage entre lame et lamelle.

Le montage entre lame et lamelle commence par l'étalage des coupes sur des lames traitée à la polysine. Ce composé permet une meilleure adhérence des coupes sur la lame. Après l'étalage des coupes et le séchage de ces dernières, on dépose dessus une lamelle classiquement préalablement enduite du milieu de montage (Ibidi Mounting Medium). Cette dernière étape permet la conservation des coupes dans un état permettant l'observation et la protection contre la lumière. Les lames sont par la suite conservées provisoirement dans de l'aluminium à 4°C.

Microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique permettant la visualisation de la coupe par fluorescence grâce à une source de lumière laser, en découpant son épaisseur de $30\mu\text{m}$ en sections optiques d'environ $1\mu\text{m}$. Le microscope confocal utilisé pour l'acquisition des images présentées dans ce rapport est le microscope confocal LSM-700 de Zeiss associé au logiciel Zen.



Schématisme des plans focaux faits par le microscope confocal sous le format d'acquisition Z-stack.

Nous avons fait deux types d'acquisition qui sont les mosaïques et les Z-stack. Les mosaïques permettent une prise de vue d'ensemble de la moelle épinière afin d'identifier la zone que l'on étudie. Les Z-stack sont des superpositions de plans focaux permettant de voir la coupe dans son épaisseur. Lors de nos différentes expériences, nous avons réalisé des triples et des quadruples marquages. Les fluorochromes utilisés se différencient par leurs longueurs d'onde d'absorption. Chacun a un spectre d'absorption particulier que l'on doit prendre en compte pour éviter les superpositions qui pourraient engendrer de faux co-marquages. Les trois fluorophores que nous avons majoritairement utilisés sont les suivants : AlexaFluor488, AlexaFluor594 et AlexaFluor647, dont les spectres d'absorption et d'émission sont présentés dans le **graphique 1** en annexe. Le traitement des images acquises est par la suite fait à l'aide du logiciel Fiji d'ImageJ. Ce dernier permettant notamment d'ajuster la luminosité et le contraste, et de superposer ou séparer les canaux bleu / vert / rouge.

RESULTATS :

Fibres neuronales de la PEZ du macaque

Nous avons d'abord analysé la présence de fibres nerveuses dans la PEZ du macaque par un marquage NF160/ β_3 tubuline. Le marquage, de cette **Figure 1.a** est vert pour les neurofilaments (NF160) dont le poids moléculaire est de 160 kDa, rouge pour les neurones de contact (β_3 Tubuline), et bleu pour le canal central de la moelle épinière. Les coupes transversales sur la **Figure 1.a**, ont été prises à différents niveaux cervicaux (**A1, B1, C1**) et à un niveau thoracique (**D1**). Les mosaïques (**A1, B1, C1, D1**) servent à l'identification des zones étudiées. Nous pouvons voir sur cette figure l'absence quasi-

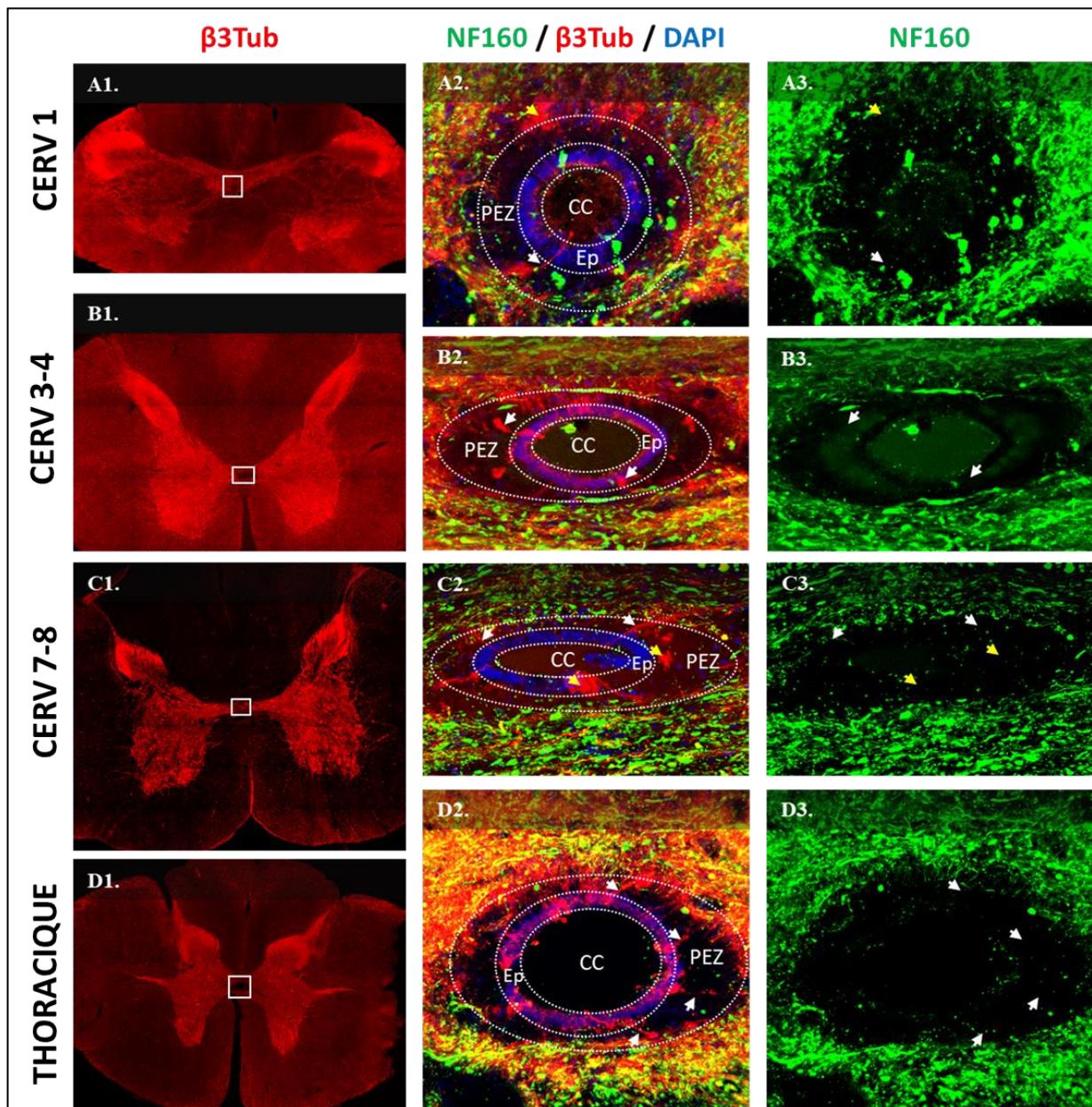


Figure 1.a : Analyse des neurones de contact et des fibres neuronales au niveau de la zone péri-épendymaire d'une moelle épinière de macaque. Coupes transversales à différents niveaux de la moelle épinière, dont le marquage réalisé est le suivant : NF160/ β_3 Tub/DAPI.

totale de marquage vert dans la PEZ, ou alors de manière non-spécifique (**B3**). Cette zone péri-épendymaire caractérisée par l'absence de marquage NF160, suit la forme du canal central lorsqu'il s'aplatit dans la zone thoracique de la moelle épinière de macaque. On observe, sur les quatre niveaux, la présence des neurones de contact $\beta_3\text{Tub}^+$ (flèches blanches), qui sont les seuls traversant la région épendymaire et sub-épendymaire. On peut observer des neurones de contact dans chaque zone, mais ils

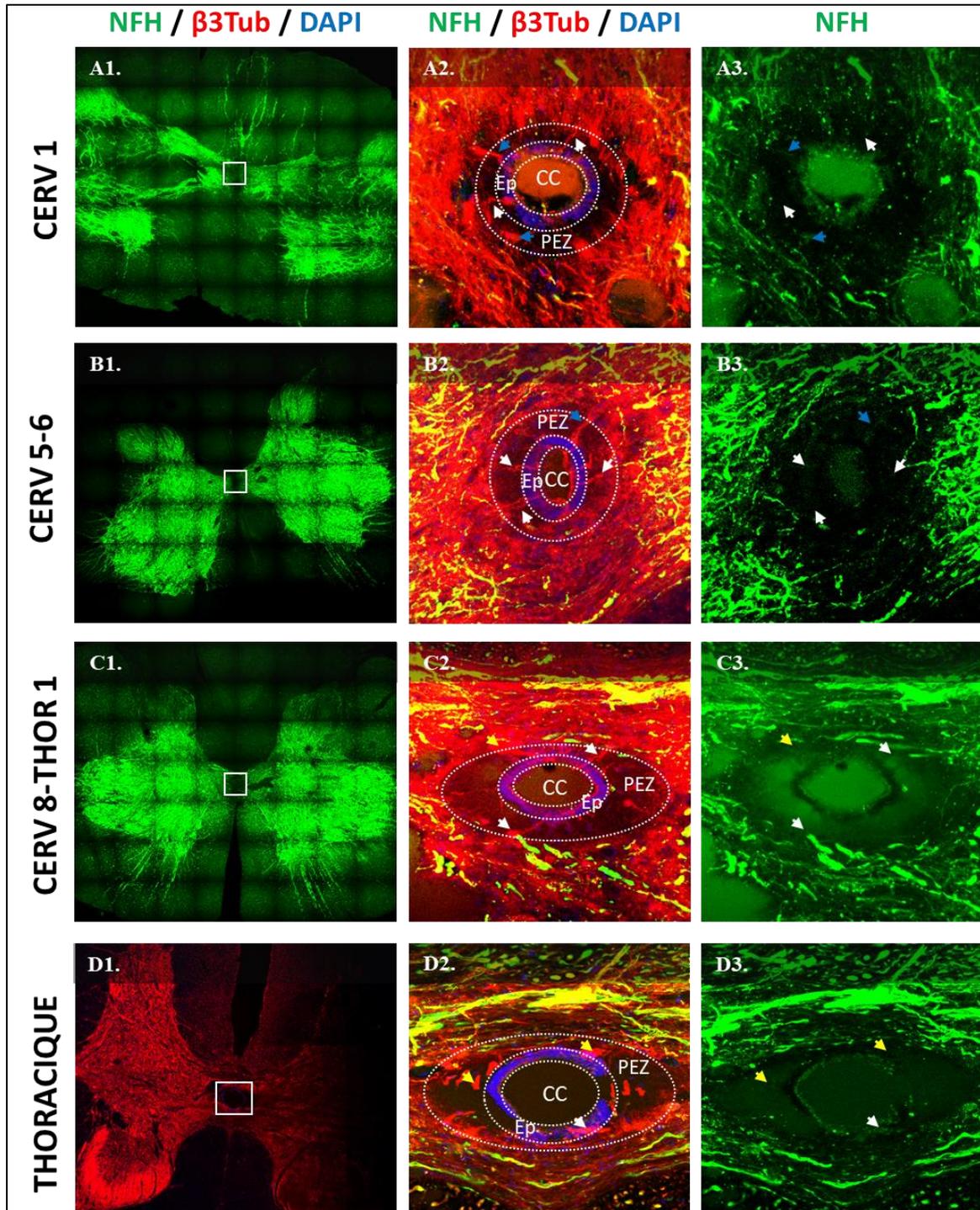


Figure 1.b : Analyse des neurones de contact et des fibres neuronales au niveau de la zone péri-épendymaire d'une moelle épinière de macaque. Coupes transversales à différents niveaux de la moelle épinière, dont le marquage réalisé est le suivant : NFH/ $\beta_3\text{Tub}$ /DAPI.

paraissent souvent intra-épendymaire dans les zones thoraciques, et plus distants dans les zones cervicales de la moelle épinière. Les Nc-LCS $\beta_3\text{Tub}^+$ ne sont absolument pas co-marqués, et les paquets de fibres (flèches jaunes) ne le sont pas non-plus. Le marquage des buds est lui plus compliqué à identifier car les fluorophores ont tendance à se coller facilement à l'intérieur du canal central, entraînant une coloration aspécifique. Mais nous pouvons avancer qu'il n'existe pas de co-marquage spécifique (rouge/vert) des buds, qui reviennent de façon récurrente.

Nous avons ensuite analysé les fibres par un marquage de la protéine NF-H. Les coupes de la **Figure 1.b** sont également des coupes transversales faites au niveau du tronc cérébrale (**A**), à un niveau cervical médian (**B**), à un niveau cervical caudal ou début thoracique (**C**), et à un niveau thoracique (**D**). Le marqueur vert indique ici les neurofilaments d'un poids moléculaire de 200 kDa. La PEZ est de nouveau bien observable avec une absence de marquage vert ou rouge significatif, autre que les neurones de contact. Nous pouvons observer des cas de co-marquage NFH/ $\beta_3\text{Tub}$ des neurones de contact (flèches bleue), mais le marquage NFH est très faibles et observables de façon irrégulière (**A** et **B**). La présence de neurones de contact non co-marqués subsiste (flèches blanches), dans lesquelles on reconnaît les neurones de contact parfois intra-épendymaux dans la zone thoracique. Les paquets de fibres $\beta_3\text{Tub}^+$ (flèches jaunes) sont toujours observables dans la PEZ mais sans co-marquage. La coloration des buds rencontre des problèmes identiques à ceux de la **Figure 1.a**, mais de façon moins forte. Nous pouvons par conséquent constater l'absence de co-marquage rouge-vert au niveau des buds.

Afin de vérifier l'absence de fibres NF160/NFH dans la PEZ, nous avons analysé des coupes longitudinales de moelle épinière. La **Figure 1.c** permet la visualisation du canal central dans sa longueur après marquage NFH/ $\beta_3\text{Tub}$ ou NF160/ $\beta_3\text{Tub}$. On y observe de très nombreux neurones de contact (flèches blanches) traversant la ceinture épendymaire. La structure des neurones de contact est très particulière avec des dendrites faisant des zig-zags avant de s'insérer dans la couche épendymaire. Quel que soit le marquage réalisé sur les coupes longitudinales (NF160 ou NFH), elles ne présentent aucun co-marquage (rouge/vert) des neurones de contact $\beta_3\text{Tub}^+$. Seuls les buds semblent parfois être marqués par l'anti-NFH (**A**), mais ces colorations ne peuvent pas être considérées comme significatives, car les fluorophores se fixent facilement sur la face interne du canal central. On distingue très bien les paquets de fibres $\beta_3\text{Tub}^+$ présents sur les coupes transversales. Il s'agit de filaments longeant le canal central et passant à proximité des neurones de contact. Ils semblent entourer le canal central en se regroupant sous la forme de plus grosses fibres, comme nous pouvons le voir sur la vignette **A2**. Mais nous ne pouvons pas conclure d'une possible connexion entre ces filaments et les Nc-LCS par ce marquage. Ces fibres ne présentent aucun co-marquage avec NFH ou NF160 (vert/rouge), qui sont absents de la PEZ.

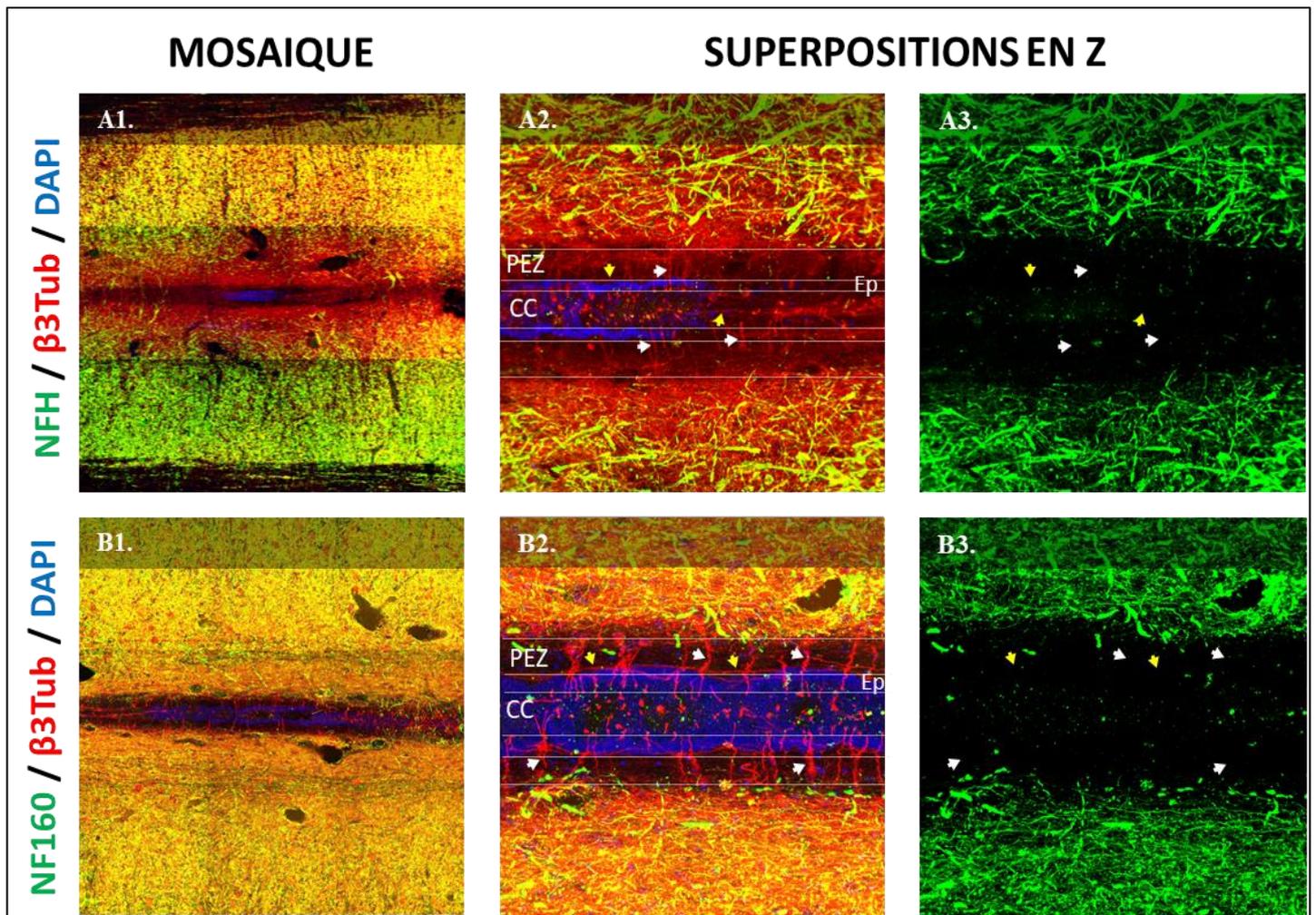


Figure 1.c : Analyse des neurones de contact et des fibres neuronales au niveau de la zone péri-épendymaire d'une moelle épinière de macaque. Coupes longitudinales, dont le marquage réalisé est le suivant : NFH/ β_3 Tub/DAPI ou NF160/ β_3 Tub/DAPI.

La zone sub-épendymaire chez le marmoset

Nous avons ensuite voulu vérifier si cette PEZ était également présente chez d'autres primates et notamment chez le marmoset (singe du nouveau monde). Les coupes présentes dans la **Figure 2** sont des coupes de marmoset marquées à l'anti-MAP2, l'anti- β_3 Tub, et au DAPI. Il s'agit de coupes faites à différents niveaux de la moelle épinière, niveau cervical rostral (**A**), niveau cervical caudal (**B**), niveaux lombaires postérieurs (**D**) et antérieurs (**C**). Toutes les zones ont été identifiées par l'utilisation d'un atlas de la moelle épinière de marmoset faiblement fourni que nous avons complété à l'aide de l'atlas de macaque. Nous pouvons observer sur les différentes coupes, en bleu, un marquage du canal central, dont la forme varie selon les zones étudiées. En effet, ce dernier est aplati sur l'axe dorso-ventral dans les régions cervicales (**A** et **B**), alors qu'il l'est plutôt sur l'axe droite-gauche dans les régions lombaires (**C** et **D**). Contrairement au macaque, les fibres neuronales de la PEZ, sont directement en contact avec le canal central. Cette observation confirme l'absence de la zone péri-épendymaire observée chez le

macaque. On y retrouve en revanche de nombreux neurones de contact (flèches blanches), qui sont plus difficiles à discerner en l'absence de cette zone péri-épendymaire, mais on observe la présence d'un neurone de contact intra-épendymaire sur la vignette (D2 ou D3). L'existence de fibres $\beta_3\text{Tub}^+$ n'est pas démontrable pour les mêmes raisons.

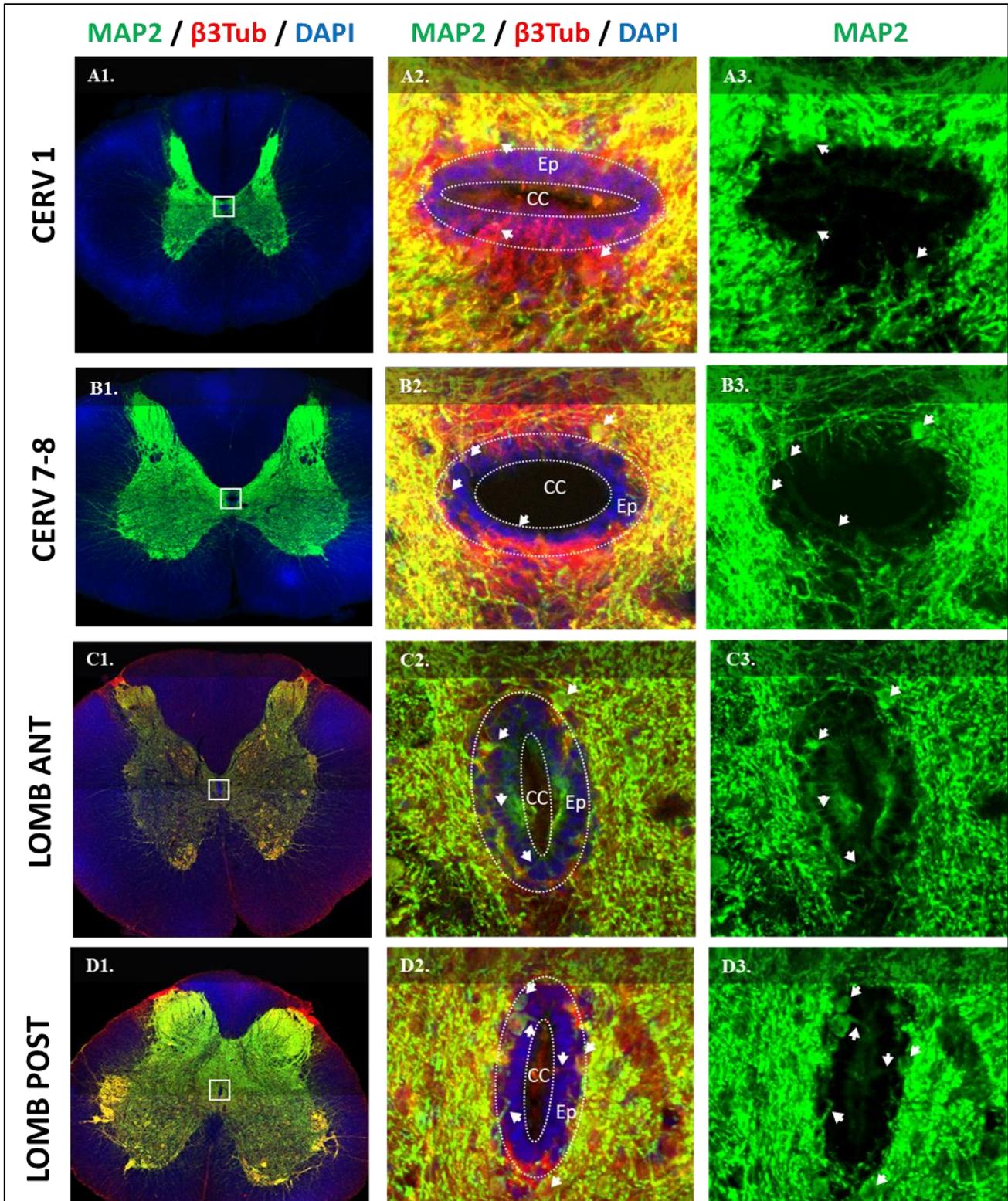


Figure 2 : Analyse de la zone sub-épendymaire d'une moelle épinière de marmoset. Coupes longitudinales de différentes zones marquées à l'anti-MAP2, l'anti- $\beta_3\text{Tub}$ et au DAPI.

Lien entre les neurones de contact et des neurones cholinergiques

Nous avons voulu savoir si le Nc-LCS reçoivent une innervation cholinergique en analysant la possibilité d'un co-marquage entre Synaptophysine et la chAT, l'enzyme principale de la synthèse de l'acétylcholine, dans la PEZ. La **Figure 3** montre des coupes de zones cervicales rostrales (**A**), médianes (**B**) et caudales (**C**), marquées par la synaptophysine et la chAT. On peut observer la PEZ présentant une absence de marquage autre que celui des Nc. Dans les trois zones présentées, des neurones cholinergiques (flèches bleues) marqués en vert, servent de contrôles positifs au marquage anti-ChAT (Choline Acétyltransférase). Quelque soit la zone d'étude, nous pouvons constater un marquage synaptophysine dans la PEZ correspondant au contact synaptique avec les Nc-LCS. Le marquage vert est tellement léger, qu'il a dû être réhaussé lors du traitement d'image. L'exemple de co-marquage le plus clair est celui sur la vignette **A2**, sur laquelle on distingue des terminaisons synaptiques sur les Nc-LCS (en rouge) exprimant la chAT (**A2**, flèche blanche de droite). Mais dans l'ensemble, la grande majorité des contacts synaptiques au niveau des Nc-LCS ne sont pas marqués avec chAT.

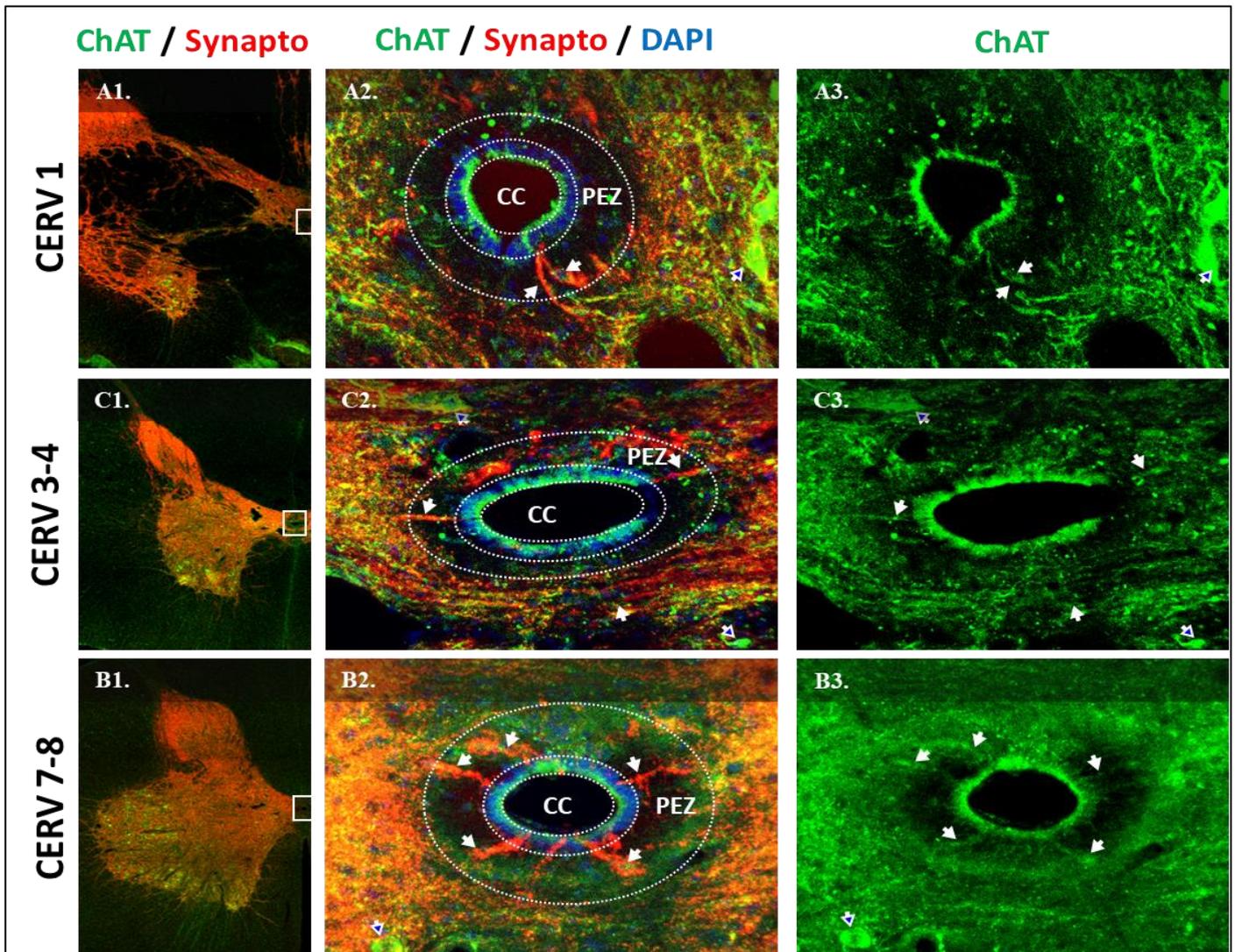


Figure 3 : Étude des possibles neurotransmetteurs utilisés dans la PEZ de moelle épinière de Macaque. Coupes longitudinales de différentes zones marquées à l'anti-Synaptophysine, l'anti-ChAT et au DAPI.

DISCUSSION :

Fibres neuronales de la PEZ du macaque

Nous pouvons tout d'abord confirmer la présence de la PEZ chez le macaque, par l'absence de marquage neuronal autre que celui des Nc. En termes de répartition, il s'avère qu'il y a bien plus de Nc intra-épendymaires dans les zones caudales que dans les zones rostrales de la moelle épinière.

L'ensemble des résultats obtenus nous indique aussi un marquage fort des neurones de contact par l'anti- β_3 Tub, un marquage faible et inconstant de l'anti-NFH, et l'absence de marquage de l'anti-NF160. La β_3 Tub et le NFH non phosphorylé sont des marqueurs synonymes d'une faible maturité des neurones de contact, ce qui confirme les résultats déjà connus. Les neurones de contact sont des neurones restant dans un état immature latent chez le macaque.

Nous devons préciser que lors de la manipulation utilisant le NFH, nous nous sommes retrouvés à cours d'anticorps primaire. Cet imprévu ne semble pas avoir impacté les résultats mais doit quand même être précisé, peut-être qu'en quantité normale, le marquage aurait été moins inconstant.

Les résultats permettent aussi de confirmer la présence de fibres longeant le canal central de la moelle épinière. Ces derniers, qui entourent la ceinture épendymaire, sont donc présents dans la zone péri-épendymaire et passent à proximité des neurones de contact, mais nous ne pouvons pas encore affirmer qu'il existe une conversation entre ces fibres et les neurones de contact. Les fibres marquées à la β_3 Tubuline, ne présentent aucun autre marquage, ce qui signifie qu'elles ont les mêmes propriétés de maturité que les neurones de contact.

La zone sub-épendymaire chez le marmoset

Chez le marmoset, nous pouvons confirmer qu'il n'existe aucune forme de zone péri-épendymaire par la présence de tissu neuronal directement en contact avec la ceinture épendymaire. Cette spécification du marmoset le différencie donc du macaque et pourrait devenir une autre caractéristique évolutive divisant les primates du nouveau (marmoset) et de l'ancien monde (macaque/homme).

Pour les autres éléments neuronaux étudiés, comme les paquets de fibres longeant le canal central et les Nc-LCS, l'absence de la zone péri-épendymaire et le marquage que nous avons effectué empêchent de les discerner correctement chez le marmoset. Nous pouvons en revanche observer les variations de la forme du canal central dont l'aplatissement varie en fonction de zone étudiée.

Lien entre les neurones de contact et des neurones cholinergiques

Le marquage permet la visualisation de la choline acétyltransférase. Cette dernière est une enzyme permettant la formation de l'acétylcholine qui est un neurotransmetteur très répandu dans le corps humain, notamment dans le système nerveux central et dans les jonctions neuromusculaires. L'anti-synaptophysine est un marqueur présynaptique, car elle compose les vésicules présynaptiques. Les résultats que nous avons obtenus n'indiquent pas de façon claire que l'acétylcholine soit le neurotransmetteur utilisé par les neurones de contact.

CONCLUSION :

Les résultats du marquage de maturité nous ont appris que les Nc-LCS ainsi que les fibres longeant le canal central du macaque expriment la β_3 Tubuline mais pas de NF160 ou de NFH, ce qui correspond à un état de maturité intermédiaire. La comparaison entre marmoset et macaque a, elle, mis en évidence l'absence totale de zone péri-épendymaire chez le marmoset, de la même façon que chez les rongeurs. Enfin la caractérisation des neurotransmetteurs n'a pas produit de résultats évidents et nécessitera de nouvelles analyses.

L'ensemble des résultats obtenus, ne sont que des étapes afin de développer au fur et à mesure du temps nos connaissances sur ces neurones de contact du liquide cérébro-spinal, et plus largement sur la région du canal central chez les primates. Alors que nous avons travaillé principalement sur le macaque et le marmoset, l'étude d'autres primates de la famille des singes du nouveau monde et de l'ancien monde permettrait de confirmer ou d'infirmer la présence d'une zone péri-épendymaire chez ces derniers. Un des objectifs à plus long terme serait d'étudier des primates évolutivement plus proches de l'Homme. Il faudrait alors se tourner vers les grands singes de la famille des Hominidae, comme le gorille. Cette approche permettrait de situer un potentiel ancêtre commun à tous les primates présentant une zone péri-épendymaire, ce qui pourrait nous orienter vers la compréhension du rôle fonctionnel de ces neurones de contact.

La caractérisation des neurotransmetteurs présynaptiques des neurones de contact du liquide cérébro-spinal pourrait se poursuivre en visant cette fois-ci des neurotransmetteurs de la famille des amines comme la sérotonine, afin de localiser les zones d'échanges entre les neurones de contact et le reste du système nerveux central.

Enfin, pour ce qui est des possibles relations entre les neurones de contact du liquide cérébro-spinal et la niche de cellules souches située au niveau du canal central, nous pouvons nous demander si ces neurones ne pourraient pas jouer un rôle dans la neurogénèse et par conséquent dans la réparation de la moelle épinière en cas de lésion.

BIBLIOGRAPHIE :

- 1 Orts-Del'Immagine A, Kastner A, Tillement V, Tardivel C, Trouslard J, et al. (2014) Morphology, Distribution and Phenotype of Polycystin Kidney Disease2-like 1-Positive Cerebrospinal Fluid Contacting Neurons in The Brainstem of Adult Mice. PLoS ONE 9(2): e87748. doi:10.1371/journal.pone.0087748
- 2 Kastner Anne, SpiCCI, INT. Conference about cerebrospinal fluid contacting neurons and the central canal cell niche. GRMEP/INT/AMU.
- 3 Jurčić, N, Michelle, C, Trouslard, J, Wanaverbecq, N, & Kastner, A. (2021). Evidence for PKD2L1-positive neurons distant from the central canal in the ventromedial spinal cord and medulla of the adult mouse. European Journal of Neuroscience, 00, 1– 23. doi : 10.1111/ejn.15342
- 4 Apkarian V, Hodge C. (1989) Primate Sphothalamic Pathways: I. A Quantitative Study of the Cells of Origin of the Spinothalamic Pathway. The Journal of Comparative Neurology : 288A47-473.
- 5 Hironobu Tokuno, Ikuko Tanaka, Aya Senoo, Yoshitomo Umitsu, Toshikazu Akazawa, Yasuhisa Nakamura, Charles Watson. (2011) Internet-based atlas of the primate spinal cord. Neuroscience Research, Volume 70, Issue 1, May 2011, Pages 128-132, ISSN : 0168-0102, doi : 10.1016/j.neures.2011.01.016.
- 6 Site de l'Institut des Neurosciences de la Timone, équipe SpiCCI. (2021) : <http://www.int.univ-amu.fr/spip.php?page=equipe&equipe=SpiCCI&lang=fr>

ANNEXE :

Graphiques représentant l'intensité des bandes d'absorptions (1) ou d'émissions (2) en fonction de la longueur d'onde pour les fluorophores **AlexaFluor488**, **AlexaFluor594** et **AlexaFluor647**.

