

Université de Montréal

# **Régulation par l'activité glycinergique des mécanismes cellulaires et moléculaires durant la neurogenèse embryonnaire**

par Abdelhamid Bekri

Département de biochimie et médecine moléculaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* en biochimie

Décembre 2019

© Abdelhamid Bekri, 2019

Université de Montréal  
Département de biochimie et médecine moléculaire

*Cette thèse intitulée*

# **Régulation par l'activité glycinergique des mécanismes cellulaires et moléculaires durant la neurogenèse embryonnaire**

*Présentée par*  
**ABDELHAMID BEKRI**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**MARTINE RAYMOND**  
Président-rapporteur

**PIERRE DRAPEAU**  
Directeur de recherche

**ADRIANA DI POLO**  
Membre du jury

**MARC EKKER**  
Examineur externe

**JANNIC BOEHM**  
Représentant de la doyenne

## Résumé

Dans le système nerveux central adulte, la glycine est principalement connue pour son rôle de transmission d'un signal inhibiteur à l'intérieur des neurones matures, régulant ainsi l'activité du réseau neuronal. Paradoxalement, durant l'embryogenèse, ce même neurotransmetteur génère une transmission excitatrice produisant ainsi le premier signal électrique dans les neurones immatures. Le rôle et la signification fonctionnelle de ce changement d'activité durant le développement neurologique restent toujours inconnus. En utilisant l'embryon du poisson-zèbre comme modèle, nous avons exploré les mécanismes moléculaires et cellulaires dépendants de la signalisation de glycine dans les cellules souches neuronales (CSNs).

En premier lieu, nous avons développé un outil d'analyse basé sur une combinaison de deux éléments: une lignée transgénique qui exprime du GFP dans les CSNs et la technique de séquençage de l'ARN total. Nous avons utilisé cette technique pour isoler et déterminer les mécanismes moléculaires régulés par la glycine dans les CSNs. Ceci a permis d'identifier plusieurs gènes candidats dont l'expression est modulée par l'activité glycinergique. Ces gènes appartiennent principalement à cinq différentes voies de signalisation canoniques incluant la voie de signalisation du calcium, TGF- $\beta$ , Shh, Wnt et p53.

Pour en apprendre davantage sur ces mécanismes moléculaires, nous avons exploré l'un d'entre eux soit la régulation de la signalisation p53 par l'activité glycinergique. En effet, nous avons démontré que l'activité glycinergique favorise la survie des CSNs par la régulation de la signalisation de p53 et agit spécifiquement sur la sous-population CSN-nestin<sup>+</sup> durant la neurogenèse.

Dans un autre projet, nous avons examiné la régulation de l'expression de *lnx1* par l'activité glycinergique. Nous avons démontré que la signalisation de glycine/*lnx1* régule la prolifération des CSNs *via* la modulation de l'activité de Notch durant la neurogenèse.

En conclusion, dans ce projet de thèse, j'ai mis en lumière plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires modulés par l'activité glycinergique dans les CSNs. Ceci peut contribuer dans le futur à la compréhension de la physiopathologie liée au dysfonctionnement de cette dernière ainsi qu'à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

**Mots-clés :** Poisson-zèbre, glycine, neurogenèse, CSNs, *p53*, *lnx1*, signalisation de Notch

## Abstract

In the adult central nervous system, glycine is mainly known as an inhibitory neurotransmitter in mature neurons, thereby regulating the neural network activity. Paradoxically, during embryogenesis, the same neurotransmitter generates excitatory transmission and induces the first electrical signal in immature neurons. The role and functional significance of this change in glycinergic activity during neurogenesis are still unknown. In this study, we used zebrafish embryos as a model to explore the glycine-dependent molecular and cellular mechanisms in neural stem cells (NSCs).

First, we developed an *in vivo* analysis method based on two main elements: a transgenic line that expresses GFP within NSCs and the RNA sequencing technique. This method of analysis was used to determine glycine-dependent molecular mechanisms in NSCs. We identified several candidate genes whose expression is modulated by the glycinergic activity. These genes participate in five different canonical signaling pathways including the calcium signaling pathway, TGF-beta, Shh, Wnt and p53.

To further understand these molecular mechanisms, we focused our investigation on the regulation of p53 signaling by the glycinergic activity. Indeed, we have demonstrated that glycinergic activity promotes the survival of NSCs by regulating p53 signaling and more specifically acting on NSC-*nestin*<sup>+</sup> subpopulation during neurogenesis.

Finally, we explored the regulation of *lnx1* expression by glycinergic activity. We have demonstrated that glycine/*lnx1* signaling regulates the proliferation of NSCs *via* the modulation of Notch activity during neurogenesis.

In conclusion, during this thesis project, I highlighted several molecular and cellular mechanisms modulated by the glycinergic activity in NSCs. These relevant results may contribute in the future to the understanding of the physiopathology related to glycinergic activity dysfunctions and the identification of new therapeutic targets.

**Keywords:** Zebrafish, glycine, neurogenesis, NSCs, *p53*, *lnx1*, Notch signaling

# Table des matières

<i>Résumé</i> .....	<i>iii</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>v</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>ix</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>x</i>
<i>Table des abréviations</i> .....	<i>xi</i>
<i>Dédicace</i> .....	<i>xii</i>
<i>Remerciements</i> .....	<i>xiii</i>
<b>CHAPITRE I</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Mise en contexte</b> .....	<b>2</b>
1.1. Découverte des neurotransmetteurs.....	2
1.2. Neurotransmetteurs.....	2
<b>2. Glycine</b> .....	<b>6</b>
2.1. Découverte de la glycine.....	6
2.2. Métabolisme de la glycine.....	6
2.3. Fonction physiologique.....	6
<b>3. Récepteurs de la glycine</b> .....	<b>8</b>
3.1. Structure des récepteurs de la glycine.....	8
3.2. Expression des récepteurs de la glycine.....	9
3.3. Récepteur de la glycine chez les mammifères.....	9
<b>4. Transporteurs de la glycine</b> .....	<b>11</b>
<b>5. Rôle de la glycine et de ses récepteurs</b> .....	<b>12</b>
<b>6. Pathologies des récepteurs de la glycine</b> .....	<b>14</b>
6.1. Chez l'humain.....	14
6.2. Chez les rongeurs.....	15
6.3. Chez le poisson-zèbre.....	16
a. Historique et utilisation du modèle poisson-zèbre.....	16
b. Avantages du modèle poisson-zèbre.....	16
c. Mutations chez le poisson-zèbre.....	17
d. Récepteurs de la glycine chez le poisson-zèbre.....	19
e. La signalisation de la glycine chez le poisson-zèbre.....	20

<b>7. Neurogenèse</b> .....	<b>22</b>
7.1. Mise en contexte .....	22
7.2. Cellules souches neurales.....	23
7.3. Propriété et régulation des CRGs embryonnaires.....	24
7.4. Régulation du cycle cellulaire des CRGs.....	25
7.5. Voies de signalisations.....	27
a. La signalisation Shh.....	27
b. La signalisation Wnt.....	27
c. La signalisation Notch .....	28
<b>CHAPITRE II</b> .....	<b>31</b>
<b>1. Problématique, hypothèse et objectifs</b> .....	<b>32</b>
<b>CHAPITRE III</b> .....	<b>33</b>
<b>1. Abstract</b> .....	<b>35</b>
<b>2. Introduction</b> .....	<b>36</b>
<b>3. Materials and methods</b> .....	<b>38</b>
3.1. Fish husbandry.....	38
3.2. Microinjection .....	38
3.3. Cloning of Glra4a:EGFP reporter constructs.....	38
3.4. Single-cell dissociation and FACS .....	38
3.5. Transcriptomic assay, differential expression assay and pathway analysis .....	39
3.6. Quantitative PCR.....	40
<b>4. Results</b> .....	<b>41</b>
4.1. FACS-purification of NSCs from whole zebrafish embryos .....	41
4.2. Glycine receptor knock-down in NSCs .....	41
4.3. Deep-sequencing and differential expression analysis of purified NSCs .....	42
4.4. Identification of pathways involved in glycine-dependent neurogenesis .....	43
<b>5. Discussion</b> .....	<b>45</b>
<b>6. Figures and legends</b> .....	<b>49</b>
<b>CHAPITRE IV</b> .....	<b>59</b>
<b>1. Abstract</b> .....	<b>61</b>
<b>2. Introduction</b> .....	<b>62</b>
<b>3. Materials and methods</b> .....	<b>64</b>
3.1. Zebrafish .....	64
3.2. Microinjection .....	64

3.3. Apoptosis assay and cell death quantification.....	64
3.4. Whole-mount in situ hybridization.....	65
3.5. Probes, cell labeling and transplantation.....	65
3.6. Confocal and time-lapse imaging.....	66
<b>4. Results .....</b>	<b>67</b>
4.1. Early, transient NSC survival defects upon disruption of glycine signaling. ....	67
4.2. Cell-autonomous NSC phenotype upon disruption of glycine signaling.....	68
4.3. The nestin+ NSC subpopulation is lost upon disruption of glycine signaling.....	70
<b>5. Discussion.....</b>	<b>73</b>
5.1. Glycine signaling suppresses programmed cell death in the CNS .....	73
5.2. Glycine signaling is required specifically for survival of nestin+ NSCs.....	75
<b>6. Acknowledgments .....</b>	<b>76</b>
<b>7. Figures and legends.....</b>	<b>77</b>
<b>CHAPITRE V.....</b>	<b>87</b>
<b>1. Abstract.....</b>	<b>89</b>
<b>2. Introduction.....</b>	<b>90</b>
<b>3. Materials and methods.....</b>	<b>91</b>
3.1. Zebrafish .....	91
3.2. FACS and RT-qPCR.....	91
3.3. Whole-mount in situ hybridization and immunostaining.....	91
3.4. Western blotting.....	91
3.5. Probes and mRNA synthesis. ....	91
<b>4. Results .....</b>	<b>92</b>
4.1. Glycine signaling suppresses <i>lnx1</i> expression and regulates neural tube development.....	92
4.2. Glycine/ <i>lnx1</i> signaling regulates Notch activity and NSCs proliferation.....	93
<b>5. Discussion.....</b>	<b>96</b>
<b>6. Author contributions .....</b>	<b>97</b>
<b>7. Acknowledgments .....</b>	<b>97</b>
<b>8. Figures and legends.....</b>	<b>98</b>
<b>9. Supplementary material and methods.....</b>	<b>104</b>
9.1. Transgenic line.....	104
9.2. FACS and RT-qPCR.....	104

9.3. Whole-mount in situ hybridization and immunostaining.....	104
9.4. Western blotting.....	105
9.5. Probes and mRNA synthesis.....	105
<b>CHAPITRE VI.....</b>	<b>108</b>
<b>1. Résultats et contribution générale.....</b>	<b>109</b>
1.1. Résumé des résultats.....	109
1.2. Pertinence et contribution générale.....	111
<b>2. Glycine, mécanisme moléculaire et neurogenèse.....</b>	<b>112</b>
2.1. Principales voies de signalisation impliquées dans la neurogène.....	112
2.2. Régulation de l'activité de Notch et de Inx1 par l'activité glycinergique.....	113
2.3. La signalisation de la glycine régule l'expression de p53.....	114
<b>3. Glycine et développement des CSNs.....</b>	<b>116</b>
3.1. La voie de signalisation glycine/Inx1 régule le développement des CSNs.....	116
3.2. La signalisation de glycine favorise la survie des CSNs durant la neurogenèse.	117
<b>4. Perspectives.....</b>	<b>119</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>123</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>143</b>



## Liste des tableaux

### Chapitre I

Tableau 1 ..... 4

### Chapitre III- Annexe

Supp. Data ..... 143

### Chapitre V

Tableau 1 ..... 108

## Liste des figures

### Chapitre I

Figure 1	.....	5
Figure 2	.....	25

### Chapitre III

Figure 1	.....	48
Figure 2	.....	50
Figure 3	.....	52
Figure 4	.....	54
Figure 5	.....	56

### Chapitre IV

Figure 1	.....	77
Figure 2	.....	78
Figure 3	.....	81
Figure 4	.....	83
Supp. Figure 1	.....	85

### Chapitre V

Figure 1	.....	99
Figure 2	.....	101
Supp.figure 1	.....	103

## Table des abréviations

Ab	Apico-basale
AJ	<i>Adherens junctions</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
<i>Beo</i>	<i>bandoneon</i>
BLBP	Brain lipid binding protein
Ca <sup>2+</sup>	Ions de calcium
Cl <sup>-</sup>	Ions chlorure
CNE	Cellules neuroépithéliales
CSN	Cellules souche neuronale
CRISPR/Cas9	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Caspase6</i>
CRG	Cellules gliales radiales
DMG	Diméthylglycine
ENU	N-nitroso-N-éthylurée
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
gARN	Acide ribonucléique guide
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GlyT	Glycine transporter
GlyR	Récepteur de la glycine
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
hpf	heures post-fertilisation
LPS	Lipopolysaccharides
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MOLT	Lignées de cellules lymphoïdes humaines
MNI	Migration nucléaire intercinétique
NICD	<i>Notch intra cellular domain</i>
PTU	1-phényl-2-thiourée
<i>Sho</i>	<i>Shocked</i>
SNC	Système nerveux centrale
SN	Système nerveux
TALEN	Transcription activator-like effector nucleases
TILLING	<i>Targeting-induced local lesions in genome</i>
TM 1-4	Transmembranaire 1 à 4
Tol2	Élément transposable
TSA	Trouble dans le spectre de l'autisme
ZSV	Zone subventriculaire
ZFN	Nucléases à doigts de zinc

## Dédicace

*À mon cher oncle Lazher qui nous a quittés trop tôt. . .*

*Paix à son âme*

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury d'avoir pris le temps et l'effort d'examiner mon travail de thèse. J'adresse aussi mes sincères remerciements aux membres du jury qui ont consacré une part de leur temps des fêtes de fin d'année pour la révision de ce manuscrit.

Je remercie aussi tous ceux qui ont fait de mon parcours académique une période aussi enrichissante et remplie d'apprentissages. D'abord et avant tout, un grand merci à Pierre Drapeau, qui a su m'apporter l'encadrement requis tout en me permettant une indépendance et une autonomie dans mon travail. Je garde en souvenir toutes nos discussions scientifiques et nos aventures ici et outre-mer. J'ai commencé mon doctorat avec un directeur de thèse, je le termine avec un mentor et un ami.

Je remercie également les membres de mon laboratoire qui m'ont permis de mettre à l'épreuve mes hypothèses et mes résultats afin de les solidifier au maximum. Je commencerai par remercier Meijiang, notre agente de recherche, pour sa disponibilité constante et quotidienne, pour tous les échanges scientifiques et techniques que nous avons eus et qui ont contribué à l'avancement de mon projet de thèse. Je tiens également à remercier Guy, Marina, Gary, Kessen, Bettina, Alexandra, Alexandre, Prasamit, Amrutha et Karl, pour leur contribution et leur apport en aide et conseils tout au long de l'avancement de mon projet de thèse.

Je remercie tous les membres de ma famille qui m'ont accordé leur soutien inconditionnel et illimité. Un remerciement spécial pour Lazher, sans lui, cette thèse aurait été impossible! Merci à mes parents d'être là pour m'encourager durant les périodes difficiles. Merci à Lamia, Saïda, Saleh et Djamel pour leurs encouragements et soutien moral.

Un merci à mes amis des quatre coins du monde qui chacun à sa façon, m'ont apporté le support nécessaire soit par leur écoute, leur humour, leur folie ou simplement leur présence. Merci à Suzanne, Saly, France, Roch, Mimi, Frank, Mous et Walid. Sans tout cet entourage, je ne serai pas là où je suis aujourd'hui.

# CHAPITRE I

Introduction générale

# 1. Mise en contexte

Dans le contexte du développement et du fonctionnement du système nerveux central (SNC), la pensée scientifique a pour longtemps été dominée par deux raisonnements clés, étant que, dans le SNC adulte, aucun nouveau neurone n'est généré et l'unique rôle des neurotransmetteurs est d'assurer l'activité neuronale. Cependant, de nombreux travaux de recherche récents contestent ce raisonnement. Ils démontrent, à travers plusieurs modèles animaux, que les neurotransmetteurs jouent aussi un rôle, direct ou indirect, dans le développement du SNC et la genèse des nouveaux neurones. Ces neurotransmetteurs agiraient ainsi comme régulateurs du développement neuronal et maintiendraient la genèse et l'activité des neurones. Dans ce projet de thèse, nous explorons ce raisonnement afin d'éclaircir le rôle des neurotransmetteurs – spécifiquement la glycine – dans le développement du SNC, en particulier la régulation de la prolifération/différenciation des cellules souches neuronales (CSNs).

## 1.1. Découverte des neurotransmetteurs

En 1926, Otto Loewi *et al.* ont démontré pour la première fois qu'une substance chimique, l'acétylcholine, transmet un signal « chimique » du nerf cardiaque jusqu'au cœur, provoquant ainsi un ralentissement du rythme cardiaque (Cheymol, 1972). Ces travaux ont valu à Otto Loewi le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1936. Dès lors, plusieurs dizaines de substances chimiques ont été découvertes, et le nouveau terme « neurotransmetteur » est né. Ce terme désignait toute substance chimique libérée par un neurone au niveau de la synapse et ayant pour cible un autre neurone ou d'autres types cellulaires. Il agissait ainsi comme une substance de transmission de signal dans le système nerveux (SN).

## 1.2. Neurotransmetteurs

Dans le SN, les neurotransmetteurs et leurs récepteurs représentent des éléments essentiels pour l'identité neuronale et surtout pour l'activité des neurones. Les neurotransmetteurs sont stockés dans des vésicules au niveau des synapses chimiques. La libération et capture de ce dernier engendrent un transfert rapide, dynamique et efficace dans la transmission de l'information au sein du SN. Ceci permet le contrôle du

comportement et des mouvements des espèces vertébrées et invertébrées. Les neurotransmetteurs sont regroupés, selon leur nature, en plusieurs classes : acides aminés, amines bioénergétiques, peptides neuro-actifs, esters ...etc. Chaque classe comporte plusieurs neurotransmetteurs qui se lient spécifiquement à un ou plusieurs récepteurs, ce qui déclenche un signal inhibiteur ou excitateur dépendamment du type de neurone (**Tableau 1**).

Dans ce projet de thèse, nous nous sommes spécialement intéressés à l'activité atypique d'un neurotransmetteur, la glycine. Cette molécule représente un des principaux neurotransmetteurs inhibiteurs dans le SNC adulte et, paradoxalement, joue un rôle excitateur durant le développement du SNC. En effet, durant la neurogenèse, la liaison de la glycine sur son récepteur provoque une entrée des ions de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) à l'intérieur des CSNs (neurones immatures), ce qui déclenche un signal excitateur. En revanche, chez les neurones matures, cette fixation empêche l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$ , induisant un signal inhibiteur dans le CNS (Ben-Ari, 2002) (**Figure 1**).

Cette différence de fonction de la glycine dans le SNC immature versus adulte a attiré ces trois dernières décennies la curiosité de plusieurs chercheurs afin de comprendre :

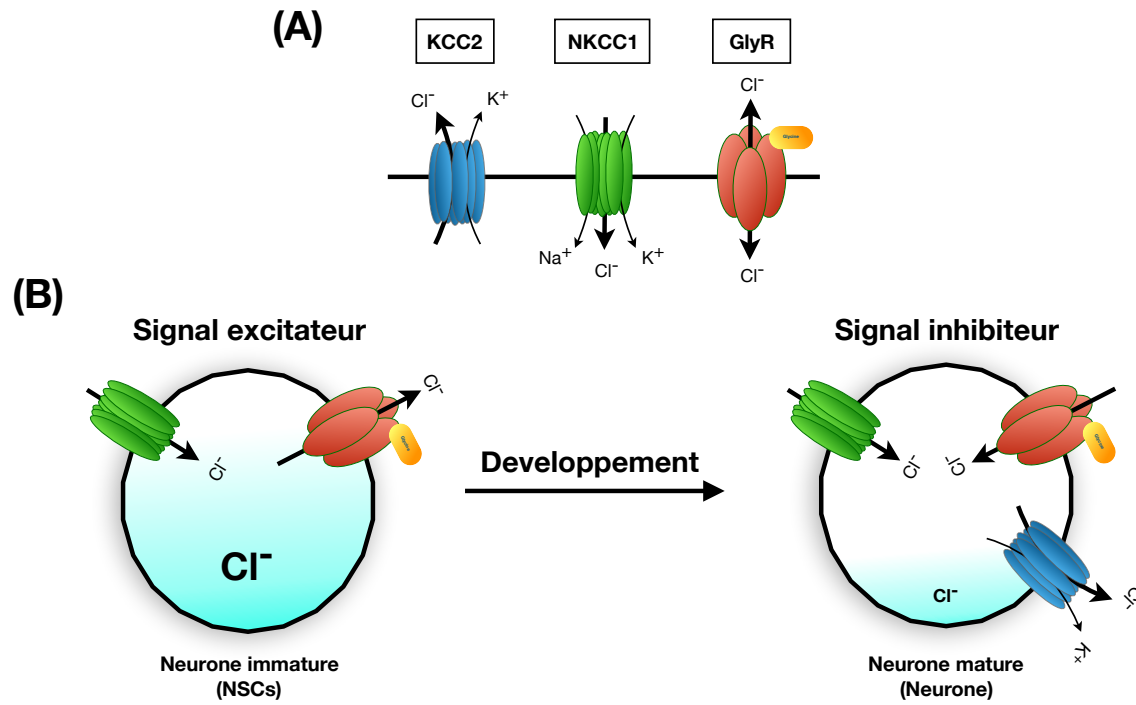
- i. Quel est le mécanisme moléculaire qui régule ce changement d'activité?
- ii. Quel est le rôle de ce changement d'activité dans le développement du SNC?
- iii. Par quel mécanisme la signalisation de la glycine peut réguler le développement du SNC?

Beaucoup d'autres questions s'ajoutent à cela, certaines étant élucidées alors que d'autres restent sans réponse. Dans ce projet de thèse, quelques-unes de ces questions importantes sont soulevées dans le but d'éclaircir le rôle de la signalisation de la glycine durant le développement embryonnaire.



<i>Neurotransmetteurs</i>	Récepteurs	Effet net sur le flux ionique	Agoniste	Antagoniste
<i>Glutamate</i>	AMPA	$\uparrow\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$	AMPA	CNQX, DNQX
	Kainate	$\uparrow\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$	Kainate	CNQX, DNQX
	NMDA	$\uparrow\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$	NMDA	AP5, AP7
	mGluR <sub>1,5</sub>	$\downarrow\text{K}^+$ , $\uparrow\text{Ca}^{2+}$	DHPG, Quspualate	
	mGluR <sub>2,3</sub>	$\uparrow\text{Na}^+$ , $\downarrow\text{Ca}^{2+}$	DCG-IV	
	mGluR <sub>4,6,7</sub>	$\downarrow\text{Ca}^{2+}$	L-AP4	
<i>GABA</i>	GABA <sub>A</sub>	$\uparrow\text{Cl}^-$	Muscimol	Bicuculline, gabazine
	GABA <sub>B</sub>	$\uparrow\text{K}^+$ , $\downarrow\text{Ca}^{2+}$	Baclofen	Saclofen
<i>Glycine</i>	Glycine	$\uparrow\text{Cl}^-$	Taurine, $\beta$ -alanine	Strychnine
<i>Dopamine</i>	D <sub>1-5</sub>	$\uparrow\text{cAMP}$	Pergolide, apomorphine	Clozapine, chlorpromazine
<i>Acetylcholine</i>	N <sub>m</sub> , N <sub>n</sub>	$\uparrow\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$	Nicotine, lobeline	Tubocurarine, Trimethaphan
	M <sub>1-5</sub>	$\uparrow\text{K}^+$ , $\uparrow\text{Ca}^{2+}$	Muscarine, bethanechol	Atropine, tropicamide
<i>Norepinephrine</i>	$\alpha_1$	$\downarrow\text{K}^+$	Phenylephrine	Prazosin
	$\alpha_2$	$\uparrow\text{K}^+$ , $\downarrow\text{Ca}^{2+}$	Clonidine	Yohimibine
	$\beta_{1,2}$	$\downarrow\text{K}^+$	Isoproterenol, albuterol	Esmolol, butoxamine
<i>Serotonine</i>	5HT <sub>1A</sub>	$\uparrow\text{K}^+$	8-OH-DPAT	Metergoline
	5HT <sub>1D,2A</sub>	$\downarrow\text{K}^+$	Sumatriptan, dobutamine	Ketanserin
	5HT <sub>3</sub>	$\uparrow\text{Na}^+$	$\alpha$ -Methyl-5-HT	Ondansertron
	5HT <sub>4</sub>	$\downarrow\text{K}^+$	5-Methoxytryptamine	

**Tableau 1.** Les récepteur et la pharmacologie des principaux neurotransmetteurs dans le système nerveux central. **AMPA** :  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid; **NMDA** : *N-Methyl-d-aspartic acid*; **DHPG** : (*S*)-3,5-Dihydroxyphenylglycine; **DCG-IV** : (2*S*,2'*R*,3'*R*)-2-(2',3'-Dicarboxycyclopropyl)glycine; **8-OH-DPAT**: 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin; **L-AP4**: *L*-2-amino-4-phosphonobutyric acid.



**Figure 1.** Le flux de cations-chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) durant la maturation neuronale. La figure représente le flux de  $\text{Cl}^-$  durant la maturation des neurones et les différentes protéines membranaires qui régulent son transport (A) les principaux protéines membranaires responsables du transport de  $\text{Cl}^-$  dans le SNC : KCC2, NKCC1 et GlyR. (B) La régulation de la concentration intracellulaire de  $\text{Cl}^-$  durant le développement des neurones.

## 2. Glycine

### 2.1. Découverte de la glycine

La glycine (glycocolle) a été décrite pour la première fois en 1820, lorsque le chimiste Henri Braconnot a pu isoler une substance encore inconnue à partir de la gélatine (Labrude and Becq, 2003). À cause de son goût sucré, cette substance a hérité du nom glycine, dérivé de « glykys » en grec ancien, qui signifie sucré. Par la suite, de nombreux chercheurs ont pu isoler la glycine à partir de différentes sources. C'est en 1846 que la composition de la glycine a été identifiée, suivie par la détermination de sa structure en 1857 par A. Cahours. Depuis, la synthèse chimique de la glycine est devenue possible (Wisniak, 2013).

### 2.2. Métabolisme de la glycine

De nombreux travaux sur la biosynthèse de la glycine ont révélé que celle-ci peut être synthétisée *in vivo* par des métabolismes endogènes chez les souris, les rats ou dans des cellules humaines (Arnstein and Neuberger, 1953, Watts and Crawhall, 1959). En effet, ces métabolismes ont été démontrés par différentes méthodes biochimiques incluant les infusions de glycine marquée ( $N^{15}$ -glycine). Ainsi, la glycine peut être biosynthétisée à partir de :

- 1- *L-serine* via l'activité de la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT) (Shemin, 1946)
- 2- *Thréonine* via la thréonine dehydrogenase (TDH) (Hartshorne and Greenberg, 1964)
- 3- *Choline* via la diméthylglycine (DMG) (Soloway and Stetten, 1953)
- 4- Le cycle du glyoxylate (Melendez-Hevia et al., 2009).

L'expression de ces enzymes peut varier entre les espèces, les tissus et le stade de développement. Ceci rend la compréhension de la biosynthèse métabolique de la glycine endogène complexe. En ce qui concerne la dégradation de la glycine alimentaire, des études chez le modèle porcin ont démontré que la majorité du surplus de glycine alimentaire est dégradée dans l'intestin grêle par différentes souches bactériennes (Dai et al., 2012, Dai et al., 2010).

### 2.3. Fonction physiologique

La glycine est le plus simple des acides aminés, classé parmi « les acides aminés non essentiels » à cause de sa présence endogène chez les mammifères (Wu, 2010). Cependant,

plusieurs études ont démontré que la quantité de glycine produite de façon endogène est insuffisante pour le besoin métabolique de l'organisme (Barone et al., 2013, Jackson, 1991, Melendez-Hevia et al., 2009, Rezaei et al., 2013). Alors qu'une légère insuffisance en glycine est considérée sans danger pour la vie, une forte baisse peut quant à elle devenir néfaste pour la santé, perturbant la réponse immunitaire et la croissance normale (de Koning et al., 2003, Lewis et al., 2005, Matilla et al., 2002). Chez les mammifères, la glycine intervient à différents niveaux dans le maintien du fonctionnement de l'organisme et joue un rôle crucial dans :

- 1- La synthèse des protéines, dont la glycine représente 11,5% du total des acides aminés dans les protéines corporelles animales (Wu, 2010).
- 2- Diverses voies métaboliques y compris la production du glutathion, créatine, ADN/ARN et hémoglobine (Hall, 1998).
- 3- Le système immunitaire, où la glycine module le flux intracellulaire du  $Ca^{2+}$  à travers les canaux chlorure, régulant ainsi la production immunitaire et la protection cellulaire (Zhong et al., 2003).
- 4- Le système nerveux, où la glycine joue un rôle de neurotransmetteur et par sa liaison sur son récepteur, elle module la transmission inhibitrice ou excitatrice des neurones et régule le mouvement et comportement chez l'animal. (Rajendra et al., 1995).

La glycine joue un important rôle dans le métabolisme des protéines, le système immunitaire, la cytoprotection de l'organisme et la régulation du SNC. Dans ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle neurotransmetteur de la glycine et au signal généré par celle-ci pour réguler le développement du SNC.

### 3. Récepteurs de la glycine

Les récepteurs de la glycine (GlyRs) sont des canaux ligand-dépendants. L'ouverture de ces canaux permet le passage passif et sélectif des ions chlorure ( $\text{Cl}^-$ ). En effet, la fixation de la glycine sur la région N-terminale du domaine extracellulaire du récepteur conduit à son ouverture et au passage du  $\text{Cl}^-$ . Ainsi, ces récepteurs à canaux anioniques permettent aux cellules de réagir rapidement aux changements de leur environnement externe. En effet, dans le système nerveux, les GlyRs sont bien connus pour générer un signal inhibiteur rapide dans le réseau neuronal (Betz, 1991). Ceci régule le mouvement et le comportement dans de nombreuses espèces.

#### 3.1. Structure des récepteurs de la glycine

Les GlyRs appartiennent à la famille des récepteurs *Cys-loop* pentamériques. En termes de structure, deux types de sous-unités ont été identifiés chez les GlyRs, soit les sous-unités  $\alpha$  (48 kDa) et  $\beta$  (58 kDa). Ces dernières forment un complexe pentamérique quasi-symétrique autour d'un pore central ionique (Lynch, 2004). Les GlyRs peuvent être formés d'un seul type de sous-unité (homo-oligomère) ou d'un mélange des deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (hétéro-oligomère) (Langosch et al., 1988, Laube et al., 2002). La composition et la formation de ces récepteurs pentamériques varient en fonction de nombreux facteurs tels que le stade de développement, la localisation et l'expression des sous-unités.

Dans le SNC adulte, les GlyRs se trouvent sous forme hétéro-oligomère comprenant trois sous-unités  $\alpha$  et deux sous-unités  $\beta$  ( $3\alpha 2\beta$ ). Cependant, durant le développement embryonnaire, les GlyRs sont formés de cinq sous-unités  $\alpha$  ( $5\alpha$ ), soit sous forme homo-oligomère (Rajendra et al., 1997). Par exemple, dans la moelle épinière adulte, les GlyRs contiennent trois sous-unités  $\alpha 1$  et deux sous-unités  $\beta$  (Kuhse et al., 1993, Langosch et al., 1988). Par contre, à des stades embryonnaires, les GlyRs sont rassemblés sous une forme homo-oligomérique contenant exclusivement des sous-unités  $\alpha 2$  (également appelées sous-unités embryonnaires) (Hoch et al., 1989). Cette différence dans la composition des GlyRs peut moduler leur conductance au  $\text{Cl}^-$  et leur niveau de sensibilité à certains agonistes et antagonistes (Bormann et al., 1993, Grudzinska et al., 2005, Kuhse et al., 1995). Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  se composent d'un long domaine extracellulaire, quatre domaines

transmembranaires (TM1-4) et une boucle intracellulaire (Du et al., 2015). À date, quatre différentes sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha 1-4$ ) ont été identifiées chez les mammifères, qui présentent une structure en acides aminés identique à 80-90%.

### **3.2.Expression des récepteurs de la glycine**

L'expression des sous-unités varie selon le stade de développement, la région et la fonction du GlyR. L'analyse par hybridation *in situ* du profil d'expression des sous-unités des GlyRs a révélé une différence spatio-temporelle de l'expression de ces gènes dans la moelle épinière, le tronc cérébral, les régions du cerveau supérieur et la rétine (Fujita et al., 1991, Kuhse et al., 1991, Malosio et al., 1991, Sato et al., 1992, Watanabe and Akagi, 1995). En effet, l'ARN messager (ARNm) de la sous-unité  $\alpha 2$  est abondant dans le cerveau et la moelle épinière aux stades embryonnaires et néonataux, tandis que l'ARNm des sous-unités  $\alpha 1$  et  $\alpha 3$  semblent être exprimés uniquement au stade post-natal. Quant à l'ARNm de la sous-unité  $\beta$ , il est largement exprimé de manière diffuse dans plusieurs régions du cerveau incluant le bulbe olfactif et le cervelet. Ce dernier ne comporte d'ailleurs pas d'expression des autres sous-unités  $\alpha$  (Fujita et al., 1991, Malosio et al., 1991).

### **3.3.Récepteur de la glycine chez les mammifères**

Chez les mammifères, quatre sous-unités Alpha (GLRA1, GLRA2, GLRA3, GLRA4) et une sous-unité Beta (GLRB) ont été identifiées dans les GlyRs (Handford et al., 1996, Patrizio et al., 2017). Alors que la *GLRA4* est considérée comme un pseudo-gène à cause du codon-STOP prématuré dans la région codante du gène, les autres gènes des sous-unités sont tous traduits en protéines et exprimés dans différentes régions du SNC (Lynch, 2009, Simon et al., 2004). Des études sur des cellules de mammifères en culture qui surexpriment ces différentes sous-unités ont révélé plusieurs configurations au niveau des GlyRs incluant A1B, A3B et A2B. Ainsi, ces différentes configurations donnent aux GlyRs une fonction spécifique dans chaque région du SNC. Des analyses par électrophysiologie de ces cellules ont montré que les configurations homo ou hétéro-oligomériques des GlyRs peuvent réguler la cinétique et la conductance de ceux-ci, ce qui module leurs fonctions (Burzomato et al., 2003, Zhang et al., 2015).

Tel que décrit précédemment, l'expression des sous-unités alpha et bêta entre le stade embryonnaire et adulte est aussi différente chez les mammifères. Alors qu'au stade embryonnaire les GlyRs sont présents en forme homo-oligomérique et l'expression de la sous-unité GLRA2 est prédominante dans la moelle épinière, au stade adulte ceci est largement remplacé par l'expression de la sous-unité GLRA1. On note aussi que la transmission dans le SNC adulte des mammifères est médiée majoritairement par des hétéro-oligomères de GlyRs formés par les sous-unités A1B ou A3B (Liu and Wong-Riley, 2013, Weltzien et al., 2012). Par exemple, chez les souris, la détection d'ARNm de *GLRA2* est principalement observée au stade embryonnaire au niveau des neurones corticaux, menant à la formation d'homo-oligomères de GlyR (Liu and Wong-Riley, 2013). Le rôle de la sous-unité GLRA2 (unité embryonnaire) a été largement étudié. Cette dernière intervient dans plusieurs processus du développement incluant le développement des interneurons (Avila et al., 2013), la neurogenèse du cortex cérébral (Avila et al., 2014) et la morphogenèse et synaptogenèse corticales (Morelli et al., 2017). Quant à la sous-unité GLRA3, elle s'associe généralement sous la forme hétéro-oligomérique, et sa détection est limitée à la couche superficielle de la corne dorsale et de la moelle épinière (Harvey et al., 2004). La fonction de la sous-unité GLRA3 est associée aux douleurs inflammatoires (Harvey et al., 2004) et à l'épilepsie du lobe temporal (Winkelmann et al., 2014).

Outre le cerveau et la moelle épinière, les sous-unités GlyRs sont aussi détectées dans la rétine. En effet, des analyses par immuno-détection ont montré la présence des sous-unités des GlyRs dans la rétine (Heinze et al., 2007), qui semblent avoir un rôle physiologique dans l'activité d'hyperpolarisation et de dépolarisation (ON/OFF) des cellules bipolaires en réponse à des stimuli de lumière (Popova, 2014).

Dans l'ensemble, comprendre la fonction des GlyRs au cours du développement dépend en partie de l'identification des éléments qui régulent le niveau d'expression de ces sous-unités durant le développement.

## 4. Transporteurs de la glycine

Dans le SNC des mammifères, deux transporteurs de glycine ont été identifiés, le transporteur de glycine 1 (GlyT1) et 2 (GlyT2). Ces deux transporteurs appartiennent à la famille des transporteurs dépendants de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ . Ils contiennent 12 domaines transmembranaires reliés par six boucles extracellulaires et cinq boucles intracellulaires. Dans le SNC, les GlyT1/2 assurent l'absorption de la glycine de l'espace extracellulaire vers l'intérieur de la cellule (Betz et al., 2006). GlyT1 et GlyT2 diffèrent considérablement dans leurs profils d'expression. GlyT1 est principalement exprimé dans les cellules gliales de type astrocyte et dans quelques populations neuronales. Celui-ci régule les concentrations de la glycine dans la fente synaptique. Alternativement, GlyT2 est exprimé dans les neurones glycinergiques et se localise principalement au niveau des terminaisons présynaptiques. GlyT2 facilite l'absorption de la glycine extracellulaire vers la terminaison présynaptique afin de limiter l'étendue de la neurotransmission et permettre le recyclage de la glycine pour un prochain flux synaptique (Betz et al., 2006).

Les souris mutantes GlyT1<sup>-/-</sup> présentent de graves troubles moteurs et respiratoires causant leur mort au stade embryonnaire. Ce phénotype est dû à une hyper-inhibition causée par l'activation prolongée des GlyRs en présence d'un niveau élevé de glycine extracellulaire (Gomez et al., 2003a). Les souris déficientes en GlyT2 meurent également après la naissance, mais leur mort survient seulement à la deuxième semaine postnatale, après avoir développé un trouble neuromoteur aigu. Leurs symptômes sont entièrement différents de ceux observés lors de la suppression de GlyT1. Dans le cas de la perte de GlyT2, une diminution de la neurotransmission glycinergique entraîne une hyperexcitabilité accompagnée de spasticité musculaire, d'une altération de la coordination motrice et des tremblements (Gomez et al., 2003b). Contrairement aux souris, les mutants poissons-zèbres GlyT1<sup>-/-</sup> présentent des troubles moteurs à des stades précoces de développement mais une récupération de la motilité après 5 jours post-fertilisation avec une survie normale (Mongeon et al., 2008).



## 5. Rôle de la glycine et de ses récepteurs

*Système immunitaire* — Plusieurs études récentes se sont intéressées au rôle de la glycine et de sa voie de signalisation dans les cellules immunitaires, spécialement dans les macrophages résidant dans le foie (cellule de Kupffer). Chez les rats, il a été démontré qu'un régime enrichi de glycine protège contre un effet inflammatoire léthal induit par des endotoxines (lipopolysaccharides-LPS), et entraîne aussi une diminution significative du niveau de facteur de nécrose tumorale TNF $\alpha$ . Cet effet de la glycine est bloqué par l'administration à faible dose de la strychnine, un antagoniste des GlyRs (Ikejima et al., 1996). De plus, des travaux de recherche effectués sur des cellules de Kupffer ont montré une hyperpolarisation de ces dernières par l'activité glycinergique (Froh et al., 2002, Ikejima et al., 1997). Ces résultats suggèrent clairement un rôle important des GlyRs dans la modulation des fonctions des cellules de Kupffer. Dans un autre type de cellules immunitaires, il a été démontré que la glycine joue un rôle anti-apoptotique dans les cellules T lymphocytaires (MOLT4) (Franek et al., 2002). Chez les rats, la glycine peut inhiber de manière dose-dépendante la croissance et la prolifération des cellules lymphocytaires, un effet qui peut être bloqué par la strychnine (Stachlewitz et al., 2000).

Bien que de nombreux travaux aient mis en évidence le rôle de la voie de signalisation de la glycine dans la prolifération, la croissance et la survie des cellules immunitaires, à ce jour plusieurs éléments demeurent inconnus concernant son mode d'action. Il y a entre autres les mécanismes moléculaires par lesquels l'activité glycinergique fonctionne. Des réponses à ces interrogations aideront à mieux comprendre le rôle de l'activité glycinergique dans le système immunitaire.

*Système nerveux* — Chez les mammifères et autres vertébrés, la neurotransmission par la glycine a été identifiée pour la première fois dans la moelle épinière, où la glycine hyperpolarise les motoneurones (Werman et al., 1967). Ceci joue un rôle central dans les réflexes et les mouvements d'ordre spinaux à travers une inhibition récurrente des motoneurones. Aussi, l'activité glycinergique est très importante pour le contrôle des voies motrices et sensorielles chez les chats (Werman et al., 1968). Cette activité est médiée par les GlyRs, localisés dans plusieurs régions du cerveau (cortex, hippocampe et cervelet).

*Autres types cellulaires* — La présence des GlyRs a été observée également dans les cellules musculaires cardiaques. En effet, chez les rats, des analyses par immunohistochimie et par immunobuvardage ont révélé la présence des GlyRs dans des tissus du myocarde et des myocytes cardiaques en culture (Qi et al., 2007). Toujours chez les rats, il a été démontré que la glycine a des propriétés cytoprotectrices. Des recherches menées sur les accidents ischémiques ont révélé que la perfusion avec de la glycine augmente la viabilité des cardiomyocytes suite à l'induction d'un accident ischémique chez les rats (Ruiz-Meana et al., 2004). La perfusion de la glycine s'est aussi révélée bénéfique pour des animaux ayant reçus une transplantation cardiaque et semblait améliorer la fonction du ventricule cardiaque (Warnecke et al., 2006).

Le rôle des GlyRs est aussi bien décrit dans les cellules germinales dans de nombreuses espèces y compris chez les humains, les rats et les hamsters. Par exemple, l'activité glycinergique est impliquée dans les réactions acrosomiques des spermatozoïdes lors du passage de ceux-ci dans la zone pellucide des ovocytes. Des études ont montré que la glycine induit un processus de fertilisation, et l'inhibition de l'activité glycinergique par une faible concentration de strychnine cause le blocage de ce processus. De plus, il a été rapporté que les rats porteurs d'une mutation au niveau de la sous-unité *GLRA1* ou *GLRB* présentent une infertilité à l'âge adulte (Kumar and Meizel, 2008, Llanos et al., 2001, Melendrez and Meizel, 1995, Sato et al., 2000).

Dans les cellules rénales, plusieurs études montrent clairement l'importance de la glycine et de son récepteur dans la cytoprotection de ces dernières. En fait, des études effectuées en culture cellulaire ont montré que l'inhibition à l'aide d'ARNs interférents de l'expression des GlyRs endogènes dans les cellules rénales, telle que les cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) et HEK (human embryonic kidney), provoque la mort de ces dernières. Cependant, la perfusion de glycine protège contre cette morte cellulaire.

Bien que de nombreuses études effectuées *in vitro* et *in vivo* fournissent des preuves du rôle cytoprotecteur de la glycine dans plusieurs types de cellules, cet effet semble être véhiculé principalement par des activités encore peu connues des GlyRs.

## **6. Pathologies des récepteurs de la glycine**

Une dysfonction de l'activité glycinergique dans le SNC est impliquée dans plusieurs troubles moteurs complexes caractérisés par une hypertonie et un réflexe de sursauts exagérés (Becker, 1990). De nombreuses études ont identifié plusieurs mutations dans les sous-unités des GlyRs impliquées dans différents troubles neurologiques incluant l'autisme, l'épilepsie et l'encéphalomyélite progressive (Bode and Lynch, 2014, Pilorge et al., 2016, Ramanathan et al., 2004, Vuilleumier et al., 2018). Des études récentes menées chez des modèles animaux dont les souris et les poisson-zèbres ont identifié et caractérisé certaines de ces mutations, ce qui a permis de comprendre quelques aspects du rôle de l'activité glycinergique dans le SNC.

### **6.1. Chez l'humain**

La perte fonctionnelle des sous-unités GLRA1 ou GLRB à cause de mutations dues à un faux-sens ou un décalage dans le cadre de lecture du gène conduit généralement à l'hyperekplexie. Cette maladie est caractérisée par diverses réactions exagérées face à des stimuli acoustiques ou tactiles inattendus qui peuvent mener à des apnées infantiles chez certains patients (Bode and Lynch, 2014, Davies et al., 2010, Harvey et al., 2008, Mine et al., 2013). Des microdélétions au niveau de la sous-unité GLRA3 ont été identifiées chez des patients atteints de maladies neuro-développementales telles que l'autisme et l'épilepsie (Ramanathan et al., 2004, Sobetzko et al., 2001). Récemment, une analyse du génome par séquençage réalisée sur un groupe de patients atteints de troubles du spectre de l'autisme (TSA) a révélé une mutation faux-sens. Celle-ci provoque une perte d'expression des GlyRs accompagnée d'une diminution de sensibilité à la glycine (Pilorge et al., 2016). Dans un contexte différent, une récente étude basée sur un dépistage systématique des mutations dans le gène GLRA2 a été réalisée chez des patients atteints de schizophrénie et d'autres maladies psychiatriques. Cette étude a identifié plusieurs mutations silencieuses sur la région codante du GLRA2, ce qui n'influence pas la structure ou la fonction du GlyR, mais peut altérer son mécanisme d'épissage (Feng et al., 2001).

Alors que chez l'humain, la sous-unité GLRA4 est considérée comme un pseudogène ne codant pour aucune protéine fonctionnelle, une étude récente a identifié une

microdélétion dans ce gène chez une patiente atteinte du syndrome du X fragile. Cette dernière présentait un trouble de déficience intellectuelle, des problèmes de comportement et des anomalies craniofaciales (Labonne et al., 2016).

Plusieurs mutations ont été identifiées au niveau des sous-unités des GlyRs et sont majoritairement associées aux troubles neurodéveloppementaux. Ceci a mené à la création et l'utilisation de plusieurs modèles animaux visant à étudier les rôles physiologiques de l'activité glycinergique dans des stades précoces du développement.

## **6.2. Chez les rongeurs**

Pour comprendre la fonction et le mécanisme de signalisation des GlyRs, plusieurs études ont été effectuées chez les rongeurs. Chez la souris, une microdélétion au niveau du gène codant pour la sous-unité *Gla1* entraîne une absence complète de la protéine dans le SNC, et les souris *Gla1*<sup>-/-</sup> meurent au stade embryonnaire (Kling et al., 1997). Cependant, les souris mutantes *Gla3*<sup>-/-</sup> ne présentent aucune mortalité prématurée ou anomalie neuromotrice. Elles démontrent par contre une diminution de la sensibilité aux douleurs inflammatoires (Harvey et al., 2004). Comme les souris *Gla3*<sup>-/-</sup>, les souris *Gla2*<sup>-/-</sup> ne démontrent aucun phénotype morphologique ou moteur particulier. Toutefois, des analyses approfondies sur ce modèle ont démontré une perturbation dans la neurogenèse au niveau de la zone subventriculaire (ZSV), accompagnée d'un déficit de la mémoire spatiale. Ces résultats, qui révèlent un rôle neurodéveloppemental des GlyRs chez l'adulte, confirment les observations cliniques chez l'humain. En effet, une mutation du gène *GLRA2* a été rapportée chez des patients TSA (Lin et al., 2017). Aussi, plusieurs études récentes effectuées chez la souris ont confirmé l'importance de la sous-unité GLRA2 dans les étapes du développement des neurones y compris la maturation, la migration et la formation des synapses neuronales (Avila et al., 2013, Morelli et al., 2017).

Dans l'ensemble, les mutations générées chez les rongeurs reproduisent des phénotypes similaires à ce qui est observé dans les pathologies humaines. Ceci est d'une grande utilité pour la compréhension de la pathophysiologie de maladies issues du dysfonctionnement de l'activité glycinergique et pour le développement de thérapies.

### 6.3. Chez le poisson-zèbre

#### a. Historique et utilisation du modèle poisson-zèbre

Les premières documentations du modèle poisson-zèbre (*Danio reiro*) remontent à 1822, suite à des explorations de la flore et de la faune en Asie du sud. Le médecin et naturaliste Francis Hamilton décrit l'espèce comme un joli poisson (*beautiful fish*), mais sans aucun goût (*insipid*) et de faibles valeurs économiques (Hamilton, 1822). Suite à cette découverte, le modèle poisson-zèbre a été utilisé dans plusieurs domaines de recherche incluant la biologie du développement, la toxicologie, l'écologie et la neurologie (Battle and Hisaoka, 1952, Endo and Ingalls, 1968, Stanton, 1965). Malgré son utilisation, le développement de ce modèle demeurait peu organisé jusqu'aux années 1970, lorsque George Streisinger, un scientifique à l'Université de l'Oregon, souhaitait utiliser un modèle vertébré plus simple que la souris et facile à manipuler génétiquement. Ce dernier a travaillé sur le développement du modèle poisson-zèbre en mettant au point plusieurs bases expérimentales clés, dont l'optimisation des soins, la sélection et l'élevage du modèle. De plus, de nombreux outils adaptés à ce modèle ont été développés tel que les techniques de mutation et l'analyse génétique et cellulaire (Streisinger et al., 1966, Streisinger et al., 1986, Streisinger et al., 1981). Depuis, une communauté grandissante de scientifiques a commencé à utiliser le poisson-zèbre comme modèle pour diverses recherches scientifiques. Actuellement, plus de mille laboratoires dans le monde utilisent le poisson-zèbre.

#### b. Avantages du modèle poisson-zèbre

Comme modèle, le poisson-zèbre offre plusieurs avantages dans l'étude des mécanismes de développement des vertébrés. Tout d'abord, l'élevage du modèle poisson-zèbre est facile. En effet, le poisson-zèbre atteint rapidement l'âge adulte (2-3 mois) et peut ensuite pondre entre 100 et 300 œufs par semaine. Ceci permet d'avoir facilement des œufs fécondés tout au long de l'année à un coût relativement bas, car un grand nombre de poissons-zèbres peuvent être maintenus dans un espace plus petit en comparaison aux autres modèles vertébrés.

Les embryons du poisson-zèbre sont transparents et leur développement progresse rapidement à 28,5 °C, avec éclosion après seulement deux jours (Kimmel et al., 1995). Ces deux propriétés facilitent les études *in vivo*. En effet, l'imagerie *in vivo* des événements est facilement réalisable dans ce modèle grâce à la transparence des embryons. Par exemple, la visualisation de l'activité neuronale dans des embryons du poisson-zèbre est facile à réaliser grâce à deux mesures, le flux calcique et le marquage de protéines par fluorescence verte *Green fluorescent protein* (GFP) (Ahrens et al., 2013). De plus, la transparence des embryons de ce modèle permet l'identification *in vivo* de différents types cellulaires marqués par des protéines fluorescentes. Malgré la formation de pigmentation qui diminue progressivement la transparence des embryons au cours du développement, plusieurs méthodes sont disponibles pour contourner ce problème. Une méthode à court terme consiste à traiter les embryons de 24 heures post-fertilisation (hpf) avec un inhibiteur de la pigmentation, le PTU (1-phényl-2-thiourée) (Karlsson et al., 2001). Une méthode à long terme consiste à utiliser des lignées déficientes en pigmentation, appelées « *casper* », ce qui facilite la visualisation et la manipulation *in vivo* du poisson-zèbre adulte (White et al., 2008).

La prédisposition à des manipulations génétiques du poisson-zèbre attire également l'intérêt de plusieurs chercheurs dans différents domaines. En effet, au cours de ces dernières décennies, plusieurs outils et approches de génétique moléculaire ont été développés pour être utilisés chez le poisson-zèbre. Au début des années 1990, un grand projet pour générer des mutants de poissons-zèbres a été mis au point. Ce projet de mutagenèse basé sur l'utilisation d'un agent mutagène chimique, le N-nitroso-N-éthylurée (ENU), a permis de générer et identifier plus de 4000 poissons mutants, incluant des mutants déficients en motilité suite au dysfonctionnement de la neurotransmission glycinergique (Haffter et al., 1996, Mullins et al., 1994).

### *c. Mutations chez le poisson-zèbre*

En 2001, la première version du séquençage complet du génome du poisson-zèbre a connu le jour. Cet événement a considérablement renforcé l'intérêt des chercheurs à utiliser ce modèle pour des études génétiques et a permis l'identification moléculaire des mutations induites par l'ENU. Par la suite, plusieurs autres techniques de mutagenèse se sont

développées telles que la technique de *targeting-induced local lesions in genome* (TILLING) (Wienholds et al., 2002), les nucléases à doigts de zinc (ZFNs) (Doyon et al., 2008) et les nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN) (Sander et al., 2011). Plus récemment, une nouvelle technique simple a été développée pour modifier et/ou éditer le génome *in vivo*. Cette technique est basée sur une courte répétition palindromique groupée et régulièrement espacée et associée à la Caspase9 (CRISPR/Cas9). Ce complexe a initialement été découvert chez des bactéries, permettant à certaines de se défendre contre des attaques de bactériophages (Garneau et al., 2010). Dans cette technique, la nucléase Cas9 est liée à l'ARN guide (ARNg) pour cibler une séquence déterminée au niveau de l'ADN génomique. Le complexe CRISPR/Cas9 induit une coupure au niveau de cette séquence ciblée grâce à l'activité nucléase du Cas9. Des études comparatives sur des cellules *in vitro* ont montré que le taux de cibles aspécifiques (OFF-target) induites par la technique du CRISPR/Cas9 est beaucoup moins élevé que ce qu'on observe avec les techniques mentionnées précédemment (Cong et al., 2013).

Bien que le système CRISPR/Cas9 est largement utilisé pour générer des mutations « *knock-out* », plusieurs travaux, notamment chez le poisson-zèbre, ont montré l'utilité de ce système pour insérer des séquences d'ADN « *Knock-in* » afin de marquer des protéines cibles avec du GFP ou d'introduire des points de mutation similaires à ce qu'on retrouve chez l'humain (Armstrong et al., 2016, Hisano et al., 2015, Kimura et al., 2014).

La technologie des morpholinos (MOs) est une autre méthode utilisée chez le poisson-zèbre pour induire la perte temporaire de la fonction d'une protéine cible (*knock-down*) (Nasevicius and Ekker, 2000). Les MOs sont des ARNs anti-sens formés de 25 bases nucléotidiques modifiées chimiquement pour ne pas être identifiées et dégradées par les ARNases. Ainsi, les MOs sont plus stables que d'autres ARNs anti-sens, ils possèdent donc une capacité très élevée à perturber/diminuer l'expression des gènes cibles. La diminution de l'expression d'un gène *via* des MOs se fait par la fixation de ces derniers sur l'ARNm cible, ce qui empêche la traduction de la protéine. Généralement, il y a deux régions de l'ARNm qui peuvent être ciblées par les MOs. Dans la première option, on peut cibler la région contenant la séquence du codon -ATG- pour bloquer l'initiation de la traduction de la protéine. En second, on peut cibler les régions communes entre un exon et un intron pour

bloquer le mécanisme d'épissage et ainsi la maturation de l'ARNm et l'expression de la protéine (Nasevicius and Ekker, 2000).

Le poisson-zèbre est également connu pour être un bon modèle animal pour générer des lignées transgéniques. En effet, grâce à des méthodes de transposon (Tol2) qui permettent d'introduire des séquences d'ADN dans le génome du poisson-zèbre, plusieurs lignées transgéniques ont été générées. Ces lignées peuvent exprimer constitutivement du *Red fluorescent protein* (RFP) ou GFP dans des cellules spécifiques pour permettre d'analyser leur mécanisme dans le poisson-zèbre (Kawakami, 2005). Par exemple, la technique Tol2 a permis d'introduire le système GAL4/UAS, initialement découvert chez la levure. Le GAL4, un activateur de transcription, est capable de se lier aux séquences consensus UAS et de diriger l'expression des gènes en aval (Asakawa and Kawakami, 2008). Ainsi, un gène d'intérêt peut être exprimé dans n'importe quel tissu suite au croisement du poisson-zèbre transgénique UAS avec un poisson-zèbre transgénique conducteur GAL4 spécifique au tissu d'intérêt (Bekri et al., 2019). De nombreux domaines de recherche utilisent ce système à des fins d'imagerie et d'analyses *in vivo* des cellules marquées.

En conclusion, ces différentes méthodes de manipulation génétique apportent un avantage et une préférence à l'utilisation du modèle de poisson-zèbre dans les études requérant des manipulations génétiques.

#### *d. Récepteurs de la glycine chez le poisson-zèbre*

Chez le poisson-zèbre, on compte cinq sous-unités  $\alpha$  (glra1, glra2, glra3, glra4a et glra4b) et deux sous-unités  $\beta$  (glrba et glrbb) qui peuvent former les GlyRs (Low et al., 2018). Il est à noter que chez le modèle du poisson-zèbre, il est fréquent de trouver plusieurs orthologues distincts d'un gène de mammifère en raison d'une duplication du génome au cours de l'évolution du poisson-zèbre (Postlethwait et al., 1998). En ce qui concerne les GlyRs, l'analyse phylogénétique suggère que les sous-unités glra1, glra3 et glra4b sont des orthologues des mammifères des sous-unités GLRA1, GLRA3 et GLRA4, respectivement.

Récemment, l'expression spatio-temporelle durant le développement embryonnaire des différentes sous-unités du GlyR a été analysée par hybridation *in situ* et qRT-PCR. Une



présence dominante au stade 0 hpf (avant la première division cellulaire) de l'ARNm maternel des sous-unités *glra1*, *glra4b*, *glrba* et *glrbb* est observée. Par la suite, le niveau d'ARNm de ces sous-unités diminue durant les premières 17 hpf alors qu'une augmentation du niveau d'expression des sous-unités *glra4a* et *glra3* est observée (0-27 hpf) ainsi qu'une expression relativement constante de la sous-unité *glra2* (Low et al., 2018).

Comme pour les autres modèles vertébrés, le profil d'expression des sous-unités des GlyRs chez le poisson-zèbre varie selon les régions et le stade de développement. En effet, des analyses par la technique d'hybridation *in situ* sur des embryons entiers au stade 24-48 hpf ont révélé une divergence dans le profil d'expression des sous-unités du GlyR. Dans les embryons de 24 hpf, les sous-unités de GlyRs sont localisées dans le télencéphale, le rhombencéphale et en forte expression au niveau de la moelle épinière. De plus, l'expression des sous-unités *glra1* et *glr4b* a été localisée dans la rétine au niveau de la couche de cellules ganglionnaires (Devignot et al., 2003, Hensley et al., 2011, Hirata et al., 2005, Imboden et al., 2001, Low et al., 2018).

Malgré quelques recherches présentes concernant l'expression des sous-unités des GlyRs dans le poisson-zèbre, les résultats ne sont pas toujours consistants. Les détails sur ce sujet demeurent alors encore ambigus.

#### *e. La signalisation de la glycine chez le poisson-zèbre*

Chez le poisson-zèbre, plusieurs études ont été effectuées pour comprendre le rôle de la signalisation de la glycine dans le système nerveux central (SNC). En effet, la prédisposition du poisson-zèbre à générer des modèles mutants, ainsi que la facilité d'accès à des analyses *in vivo* afin de mesurer l'activité neuronale ont suscité l'intérêt de la communauté scientifique. Le grand projet de mutagenèse ENU a permis d'identifier deux mutants, *bandoneon* (*beo*) et *shocked* (*sho*), présentant un défaut de mobilité causé par des mutations dans les gènes *glrbb* et *GlyT1* (glycine transporter 1), respectivement. Ces deux gènes jouent un rôle primordial dans la régulation de la signalisation de la glycine et dans la gestion du flux de la glycine dans le SNC. Chez les mutants *beo*, l'enregistrement de l'activité neuronale par électrophysiologie a révélé des fluctuations aberrantes et

arythmiques en réponse à une stimulation tactile, indiquant un dysfonctionnement dans la transmission glycinergique au niveau du SNC (Hirata et al., 2005). Le mutant *sho* présente aussi une réduction de motilité due à un défaut dans les synapses glycinergiques. La perte de fonction de la protéine GlyT1 provoque une accumulation de la glycine à l'extérieur de la cellule. Ceci va stimuler une suractivité de la synapse glycinergique, et causer une perturbation de la fonction neuronale. Par conséquent, un défaut de motilité chez le poisson-zèbre est identifié durant l'embryogenèse. Ce défaut de motilité est partiellement restauré par l'antagoniste des GlyRs, strychnine (Cui et al., 2005).

Autre que la mutagenèse, la perturbation de l'activité glycinergique est induite par d'autres approches telles que les MOs « *Knock-down* ». Effectivement, plusieurs MOs ont été dessinés pour cibler les différentes sous-unités des GlyRs. La plupart des résultats de la perte de fonction *via* cette technique ont montré une perturbation de l'activité physiologique des neurones suivie par une perte de motilité des embryons de poisson-zèbre au stade 48 hpf. De plus, au niveau cellulaire, une réduction des différentes populations d'interneurones est rapportée, accompagnée d'un maintien de la prolifération des CSNs (Brustein et al., 2013, Cote and Drapeau, 2012, Hirata et al., 2013, McDearmid et al., 2006).

Ces résultats démontrent pour la première fois un rôle potentiel de la signalisation de la glycine dans la neurogenèse durant le développement embryonnaire. Des recherches approfondies sont requises pour mieux comprendre ce processus.

## 7. Neurogenèse

### 7.1. Mise en contexte

Dans le SNC, la neurogenèse représente l'ensemble des processus cellulaires comprenant la division, la migration et la différenciation des CSNs afin de donner naissance à des neurones matures et fonctionnels. Depuis de longues années, les neuroscientifiques ont associé la neurogenèse au développement embryonnaire (neurogenèse primitive) et considéraient que cette dernière est figée à l'âge adulte. Cependant, la découverte dans les années 60 de cellules qui se divisent dans le cerveau adulte a changé la perception des chercheurs du système nerveux à ce stade. En effet, plusieurs études ont démontré que la prolifération postnatale persiste dans pratiquement toutes les espèces étudiées, y compris les rongeurs (Altman and Das, 1965), les primates (Kornack and Rakic, 1999) et les humains (Kukekov et al., 1999).

La neurogenèse à l'âge adulte est souvent considérée comme la continuation des processus de neurogenèse embryonnaire (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Ceci est illustré par la similitude morphologique des CSNs entre le stade embryonnaire et adulte, tous deux comportant des cellules en forme radiale (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009, Taverna et al., 2014). Cependant, malgré les similitudes morphologiques entre les CSNs embryonnaires et adultes, de nombreuses différences sont notées, incluant les processus cellulaires tels que la prolifération et la différenciation, l'expression des gènes et les voies de signalisation qui les régulent. Effectivement, le taux de prolifération représente une grande différence entre les CSNs embryonnaires et adultes, principalement due à la différence dans la régulation du cycle cellulaire entre les deux stades. Alors que les CSNs embryonnaires ont un cycle cellulaire pouvant durer entre 10 et 18 h, la plupart des CSNs adultes sont quiescentes ou ont un cycle cellulaire très long pouvant durer jusqu'à deux semaines (Arai et al., 2011, Bonaguidi et al., 2011, Dehay and Kennedy, 2007).

Grâce à la prolifération active des CSNs embryonnaires, le développement du système nerveux s'effectue dans un laps de temps relativement court et dans lequel les CSNs se divisent activement et se différencient pour donner naissance à des neurones fonctionnels. Ce processus est généralement orchestré par des microenvironnements qui fournissent des

facteurs intrinsèques et extrinsèques essentiels afin de maintenir le développement et la stabilité du système nerveux jusqu'à l'âge adulte. Les CSNs représentent l'élément d'origine pour générer des neurones fonctionnels et former le système nerveux adulte. Généralement, deux propriétés caractérisent les CSNs : l'autorenouvellement par des divisions cellulaires symétriques ou asymétriques, et le caractère pluripotent qui leur permet de générer différents types de cellules neuronales matures.

## **7.2. Cellules souches neurales.**

Durant la neurogenèse embryonnaire, le tube neural est formé d'une couche unique appelée le neuroépithélium. Cette dernière se compose principalement de CSNs appelées cellules neuroépithéliales (CNEs), des cellules en division constante durant la neurogenèse embryonnaire. Les CNEs sont caractérisées par une forte polarisation le long de leur axe apico-basal (Ab) et un cycle cellulaire défini par une migration nucléaire intercinétique (MNI) sur leur axe Ab (Spear and Erickson, 2012). L'identification des CNEs est basée sur l'expression de certains marqueurs spécifiques tels que le CD133 (prominin-1) (Corbeil et al., 2010), les protéines de jonction, dont les Tight Junctions (TJs) et Adherens Junctions (AJs) (Aaku-Saraste et al., 1996) et les intégrines (récepteurs d'adhésion cellulaire) (Marchetti et al., 2013).

Au cours de la neurogenèse embryonnaire, les CNEs se transforment et donnent naissance à un autre type de CSNs appelées cellules radiales gliales (CRGs). Ces dernières partagent avec les CNEs certaines caractéristiques comme la MNI lors de la division cellulaire. Aussi, elles gardent l'expression de quelques marqueurs de polarité cellulaire comme les CD133, ZO1 et PAR3. Cependant, les CRGs se distinguent des CNEs dans plusieurs propriétés comme la diminution du trafic apical des appareils de Golgi, la perte des jonctions serrées et l'expression des marqueurs des cellules astrocytaires tels que Glutamate Aspartate Transporter (GLAST), Brain Lipid Binding Protein (BLBP), Ca<sup>2+</sup>-binding protein (S100β) et glial fibrillary acidic protein (GFAP) (Gotz, 2003, Kriegstein and Gotz, 2003). De plus, elles expriment transitoirement des facteurs de transcription appartenant à la famille Hairy and enhancer of split (Hes) et Fibroblast growth factor 10 (Fgf10), qui sont nécessaires pour la transition et la neurogenèse embryonnaire (Hatakeyama et al., 2004, Imayoshi et al., 2015, Kageyama et al., 2018, Sahara and

O'Leary, 2009, Wilsch-Brauninger et al., 2016). À cause des similitudes observées entre les CNEs et les CRGs, les mécanismes cellulaires qui régulent cette évolution sont difficiles à cerner.

### **7.3. Propriété et régulation des CRGs embryonnaires**

Les CRGs embryonnaires sont des CSNs fortement polarisées, leurs membranes apicale et basale sont respectivement en contact avec le ventricule (face apicale) et la lame basale. Cette caractéristique expose les CRGs à de nombreux facteurs de régulation. En effet, le domaine apical des CRGs contient de nombreuses protéines de polarité telles que les Protease activated receptor 3 et 6 (Par 3 et 6) ou encore la Apical protein Kinase C (aPKC). Ces dernières jouent un rôle clé non seulement dans la polarisation des CRGs, mais aussi dans la régulation de leur prolifération (Costa et al., 2008, Ohno, 2001). En outre, de nombreuses protéines telles que les protéines Scratch, Forkhead transcription factors (Foxp) et Neurog, qui sont exprimées dans la région apicale des CRGs, jouent un rôle important dans le mécanisme de délamination et de migration des CRGs (Das and Storey, 2014, Itoh et al., 2013, Rousso et al., 2012). Dans ces processus, les CRGs perdent leurs polarités apicales pour se différencier en neurones matures.

La région apicale contient des cils primaires qui jouent un rôle primordial dans le développement des CRGs durant la neurogenèse. En effet, au début de la neurogenèse, les cils primaires sont impliqués dans le maintien de la polarité et régulent la transformation des CNEs en CRGs (Willaredt et al., 2013). Au cours de la neurogenèse, l'activité des cils primaire est associée à la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh), cette dernière régulant la prolifération des CRGs (Wang et al., 2011).

À l'opposé du domaine apical des CRGs, on retrouve le domaine basal qui représente une extension des CRGs vers leur corps cellulaire. À l'origine, le processus basal était considéré comme un support pour la migration des progénitures, soit les nouveaux neurones (Rakic, 1972, Rakic, 2003). Toutefois, des observations récentes obtenues par des manipulations génétiques avancées et des méthodes microscopiques montrent que le processus basal a des rôles supplémentaires. En effet, des travaux ont montré que le processus basal est impliqué dans le maintien de la prolifération des CRGs basales grâce à

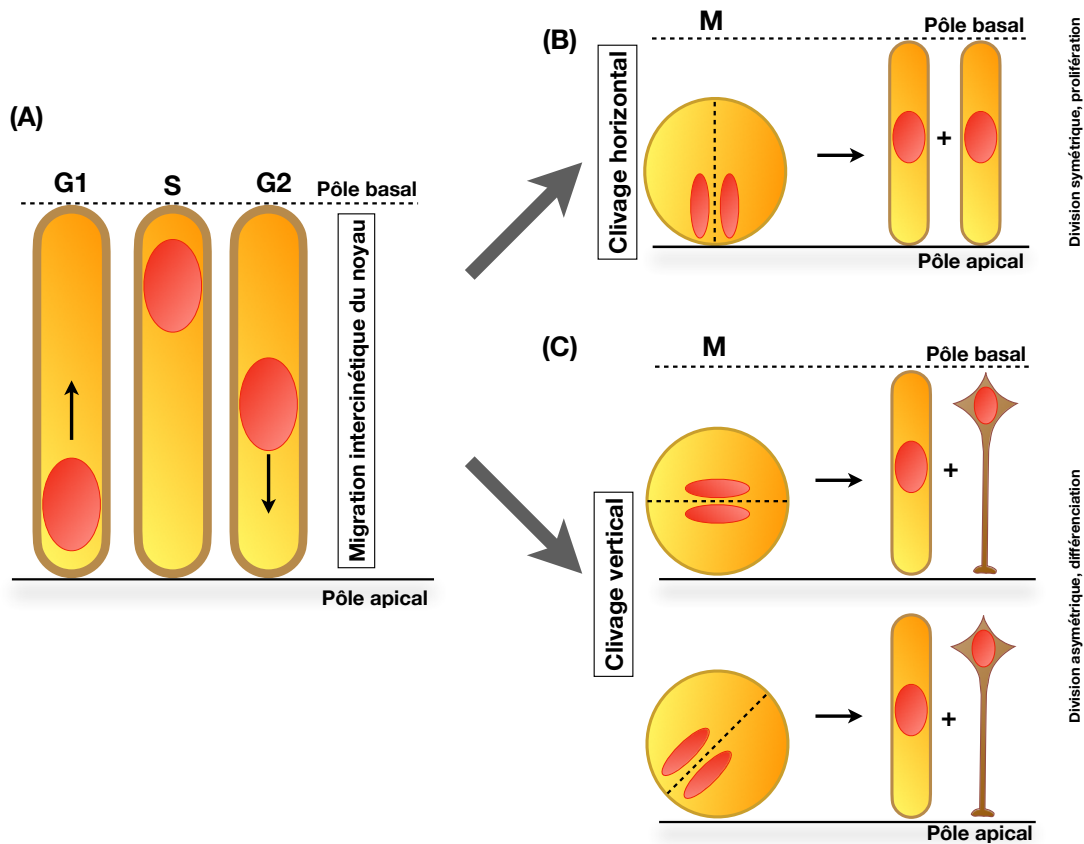
la signalisation des intégrines situées à la surface de la lame basale. Celles-ci permettent la régulation de la phase G1-S et de la protéine Cycline D2 (Fietz et al., 2010, Tsunekawa et al., 2012).

#### **7.4.Régulation du cycle cellulaire des CRGs**

Au cours de la neurogenèse, les CRGs se divisent pour maintenir la population, mais aussi pour donner naissance à des nouveaux neurones différenciés. Ce processus est réalisé grâce à des divisions de type symétrique ou/et asymétrique des CRGs. En effet, la division symétrique donne lieu à deux CRGs filles identiques entre elles et identiques à la cellule mère. Ce type de division est généralement maintenu pour promouvoir la prolifération et l'auto-renouvellement des CRGs. Quant à la division asymétrique des CRGs, elle ne génère qu'une CRG fille identique à la mère ainsi qu'une deuxième cellule différenciée. Ce type de division est qualifié de division neurogénique à cause de son potentiel à générer des neurones.

Plusieurs recherches se sont intéressées au processus qui gouverne la régulation de la division symétrique/asymétrique des CRGs. Dans plusieurs résultats, la polarité Ab des CRGs ressort comme un élément de base important pour la division symétrique/asymétrique. En effet, des analyses ont montré qu'une distribution égale ou inégale des constituants cellulaires sur l'axe Ab des CRGs régule et détermine le type de division de ces dernières (Lesage et al., 2010, Wen and Zhang, 2018). Chez les vertébrés, la division asymétrique des CRGs est médiée par une dispersion inégale des protéines de polarité et de celles impliquées dans la détermination du devenir cellulaire. Ainsi, durant une division asymétrique des CRGs, les protéines de polarité tel que Par3 sont séparées de manière asymétrique dans une cellule fille (Bultje et al., 2009, Kosodo et al., 2004). On note aussi plusieurs protéines cytoplasmiques distribuées d'une manière inégale dans les divisions asymétriques des CRGs. Par exemple, la protéine Staufén, une protéine qui se lie à de l'ARN double brin, favorise la différenciation des CRGs (Kusek et al., 2012, Vessey et al., 2012). Aussi, le ligand Delta et l'antagoniste Numb de la voie de signalisation Notch sont dispersés différemment lors de la division asymétrique, ce qui conduit à une signalisation de Notch différentielle entre les cellules filles (Dong et al., 2012, Kawaguchi et al., 2013, Kim et al., 2013) (**Figure 2**).

Malgré ces nombreuses études qui décrivent la présence de cette partition inégale le long de l'axe Ab des protéines de polarité, des protéines cytoplasmiques et de certaines voies de signalisations, les mécanismes sous-jacents qui contrôlent ces éléments sont toujours peu connus.



**Figure 2.** Polarité et division des CSNs. La figure résume l'organisation polarisée des CSNs entre le pôle basal et apical du SNC. **(A)** Représentation schématique de la polarité des CSNs et la migration intercénétique du noyau entre le pôle basal et apical durant les phases G1, S et G2 du cycle cellulaire. **(B)** Représentation schématique du clivage horizontal du noyau à la phase M du cycle cellulaire lors de la division symétrique (prolifération) des CSNs pour donner deux CSNs filles. **(C)** Représentation schématique du clivage vertical et oblique du noyau à la phase M du cycle cellulaire lors de la division asymétrique (différenciation) des CSNs pour donner une CSN fille et un neurone différencié.

## 7.5. Voies de signalisations

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation spatio-temporelle des CRGs. Ainsi, de nombreuses études ont mis en évidence la régulation de la neurogenèse par différentes voies de signalisation telles que les voies de Notch, Wnt, Shh, BMP et Fgf. Plusieurs de ces voies de signalisation ont un effet sur la prolifération et la différenciation des CRGs et représentent l'objet d'une diaphonie considérable dans la régulation de celles-ci.

### *a. La signalisation Shh*

Découverte en 1990, la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) est essentielle pour l'organisation dorso-ventrale du SNC durant l'embryogenèse. La fixation du ligand Shh sur son récepteur membranaire patched (Ptc) permet de lever l'inhibition que Ptc exerce sur le récepteur membranaire Smoothened (Smo). Ceci active la voie de Shh et déclenche une cascade de signalisation intracellulaire complexe qui met en jeu plusieurs éléments régulant le développement des CSNs. Parmi les protéines activées, on y trouve certains facteurs de transcription de la famille Gli, qui jouent un rôle redresseur en l'absence d'activité de la voie Shh. Ainsi, il a été montré que l'activation de ces facteurs *via* la voie Shh régule le cycle cellulaire des CRGs et leur différenciation (Shikata et al., 2011, Wang et al., 2011).

La voie de signalisation Shh régule la balance entre les divisions symétriques et asymétriques des CRGs. Une réduction de l'activité de Shh réduit la division symétrique des CRGs et favorise la division asymétrique, et ainsi la différenciation des CRGs (Dave et al., 2011, Saade et al., 2013). Durant le développement du néocortex, l'activation de la voie de signalisation Shh favorise la division symétrique des CRGs par l'activation de la voie Notch dans les CRGs (Dave et al., 2011), montrant ainsi l'existence d'une communication et d'une corrélation significative entre les voies Shh et Notch dans la régulation de la différenciation des CRGs.

### *b. La signalisation Wnt*

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine est très conservée dans plusieurs espèces vertébrées et contrôle le devenir des cellules souches au cours du développement



embryonnaire. La découverte de cette voie a été amorcée au début des années 1980, avec la découverte chez la souris du gène proto-oncogène *integration 1* (*Int1*). Ceci a été suivi par plusieurs investigations dans d'autres modèles animaux, notamment chez la *Drosophila* où le gène *wingless* (*Wg*) (orthologue du gène *Int1*) est connu par son rôle dans la polarité et le développement de l'axe de segmentation durant l'embryogenèse. Depuis, plusieurs gènes de la famille Wnt (*Wg/Int*) ont été découverts.

Durant le développement neuronal, la signalisation wnt/ $\beta$ -caténine se déclenche lors de la fixation du ligand wnt sur son récepteur Fz/LRP5-6 (Frizzled/lipoprotein receptor-related protein 5-6). Ceci va déclencher une cascade de réactions cytoplasmiques conduisant à la stabilisation de la protéine  $\beta$ -caténine, qui va à son tour se déplacer à l'intérieur du noyau pour induire l'expression de certains gènes *via* l'activation des facteurs de transcription tels que LAF (Lymphoid enhancer-binding factor) et TCF (Transcription factor). Durant la neurogenèse, la signalisation wnt/ $\beta$ -caténine peut jouer plusieurs rôles différents. Au début de la neurogenèse, la voie wnt favorise la division symétrique des CRGs et inhibe la différenciation de leurs progénitures. Cependant, plus tard dans la neurogenèse, elle favorise la différenciation des progénitures dans la région corticale du cerveau *via* la surexpression du gène *N-myc*. Effectivement, l'expression du gène *N-myc* dans les CRGs va inhiber la signalisation Notch et stimuler la différenciation neuronale (Kuwahara et al., 2010, Munji et al., 2011, Wrobel et al., 2007, Zinin et al., 2014).

Bien que la manière dont la signalisation Wnt agit dans les CRGs ne soit pas encore comprise, il est probable que les gènes ciblés changent au cours de la neurogenèse par le biais de mécanismes dépendants du contexte et des sous-types de CSNs, tels que les modifications épigénétiques (Nguyen et al., 2018).

### *c. La signalisation Notch*

Conservée durant l'évolution des espèces, la voie de signalisation Notch est essentielle pour le développement des vertébrés et invertébrés. Celle-ci a été identifiée en 1914, dans une souche mutante de *Drosophila* qui présente des entailles (*notch*) sur l'extrémité de ses ailes. Depuis, plusieurs études ont exploré la signalisation de Notch et montré sa capacité à contrôler l'interaction cellule-cellule, la prolifération, la différenciation ou l'apoptose.

Ceci attribue à la voie de Notch un rôle majeur dans la genèse de nombreux types cellulaires, notamment les cellules nerveuses, musculaires, sanguines et cardiaques.

Durant l'embryogenèse, la signalisation de Notch régule la neurogenèse à travers un processus d'inhibition latérale. Ceci permet d'établir et de stabiliser une différence de destinée au sein d'une même population de CSNs grâce à un échange réciproque de signaux inhibiteurs (Chi et al., 2012, Greenwald and Rubin, 1992, Shimizu et al., 2010). En effet, l'interaction du ligand Delta ou Jagged avec les récepteurs Notch active la signalisation Notch d'une cellule adjacente, ce qui conduit à des événements protéolytiques médiés par les protéines ADAM et  $\gamma$ -sécrétase. À l'issue de ces événements, le notch intra cellular domain (NICD) sera transloqué à l'intérieur du noyau et formera un complexe avec la protéine (Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa j region) RBPj. Celui-ci déclenchera à son tour la transcription des gènes de la famille Hes/Hey (Hairy and Enhancer of Split). Ces facteurs de transcription sont des répresseurs de la famille de gènes bHLH (basic Helix-Loop-Helix), Ngn2 (Neurogenins) et Ascl (Achaete-scute homolog), connus comme étant des gènes pro-neuronaux. Ainsi, l'activation de Notch favorise la prolifération des CSNs et empêche leurs différenciations en neurones matures (Imayoshi et al., 2013).

L'activité de Notch est négativement régulée par la protéine NUMB. En effet, l'ubiquitination du NICD par NUMB conduit à un marquage pour dégradation protéosomique (McGill et al., 2009). A son tour l'activité de NUMB est inhibée par la famille des ubiquitinases LNXs (Ligand of Numb X) (Rice et al., 2001). Ainsi elles empêchent la dégradation du NICD *via* NUMB. Ces deux ubiquitines jouent un rôle très important dans la régulation de l'activité de Notch.

Durant le développement embryonnaire, la signalisation de Notch est associée étroitement au cycle cellulaire des CRGs. Ce cycle est déterminé par la position du noyau sur l'axe Ap-B des CRGs (**Figure 2**). Ainsi, les CRGs avec un noyau en position apicale, qui représente la phase M du cycle cellulaire, expriment fortement le récepteur Notch. À l'inverse, les CRGs dont le noyau est localisé en position basale (phases S et G2 du cycle cellulaire) expriment faiblement le récepteur Notch. Ceci forme une signalisation localisée de la voie

de Notch durant la division des CRGs. Une perturbation du gradient de la signalisation de Notch interrompt le MNI des CRGs, et crée ainsi un dysfonctionnement de leurs cycles cellulaires (Del Bene et al., 2008). Par ailleurs, de récentes études chez les souris et les poussins ont révélé que la signalisation de Notch régule le choix que les CSNs doivent accomplir durant la division pour s'orienter vers un type neuronal spécifique. Ainsi, Notch peut influencer le choix du devenir des CRGs (Mizuguchi et al., 2006). De plus, la localisation de NUMB – antagoniste de l'activité Notch – au cours de la division des CRGs est déterminante pour le devenir de ces dernières. En effet, durant la division asymétrique des CRGs, la ségrégation différentielle de Numb dans les cellules filles permet d'avoir une signalisation différentielle de la voie de Notch entre les deux cellules filles, et donc une différenciation des CRGs (Dong et al., 2012, Kawaguchi et al., 2013).

# **CHAPITRE II**

Problématique et objective

# 1. Problématique, hypothèse et objectifs

**Problématique** : Durant le développement embryonnaire, le langage de la signalisation de la glycine change entre les neurones immatures (CSNs) et les neurones adultes et la perturbation de cette balance cause des troubles neurodéveloppementaux.

**Hypothèse** : La signalisation de la glycine contrôle le développement des CSNs par la régulation de leur prolifération et leur différenciation.

**Objectifs** : Explorer le rôle de l'activité glycinergique durant le développement des CSNs en déterminant les :

- I. Mécanismes moléculaires dépendants de la signalisation de glycine durant le développement des CSNs.
- II. Mécanismes cellulaires dépendants de l'activité glycinergique.
- III. Rôle de l'activité glycinergique sur le développement du SNC.

**Démarche expérimentale et publications** : Dans ce projet de thèse, nous avons utilisé le modèle poisson-zèbre pour explorer *in vivo* la perte de fonction de GlyR dans les CSNs. Nous avons utilisé cette approche pour analyser les mécanismes moléculaire et cellulaire dépendants de cette activité. Nous avons également utilisé des approches génétiques pour générer des lignées transgéniques afin d'induire l'expression de certains gènes liés à cette activité. Les résultats de ces travaux sont publiés dans trois différents articles :

**Chapitre III**: Transcriptomic Analysis of Purified Embryonic Neural Stem Cells from Zebrafish Embryos Reveals Signaling Pathways Involved in Glycine-Dependent Neurogenesis. Samarut E.\*, **Bekri A.**\*, Drapeau P. Front Mol Neurosci. 2016 Mar 31;9:22.  
\* Co-First Author

**Chapitre IV**: Glycine Promotes the Survival of a Subpopulation of Neural Stem Cells. **Bekri A.**, Drapeau P. Front Cell Dev Biol. 2018 Jul 11;6:68.

**Chapitre V**: Glycine Regulates Neural Stem Cell Proliferation During Development *via* Lnx1-Dependent Notch Signaling. **Bekri A.**, Liao M, Drapeau P. Front Mol Neurosci. 2019 Feb 18;12:44.

# CHAPITRE III

Première publication

## **Transcriptomic Analysis of Purified Embryonic Neural Stem Cells from Zebrafish Embryos Reveals Signaling Pathways Involved in Glycine-Dependent Neurogenesis**

Samarut E.<sup>1,\*</sup>, **Bekri A.**<sup>1,2,\*</sup>, Drapeau P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurosciences, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

\* Co-First Author

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE –front. Mol. Neurosci., 31 March 2016

**Mise en contexte** — Cette première étude a été conçue pour déterminer les mécanismes moléculaires dépendant de la signalisation de glycine dans les CSNs. En utilisant le modèle poisson-zèbre, nous avons développé en premier lieu une technique permettant d'isoler les CSNs et d'effectuer une analyse *in vivo* des mécanismes moléculaires. En deuxième lieu, nous avons analysé par séquençage d'ARN total, les voies de signalisation régulée par l'activité glycinergique dans les CSNs durant la neurogenèse.

**Contribution** — Dans cette étude, j'ai conçu le plan général des expériences et j'ai contribué au développement de la technique d'isolation des CSNs et l'extraction de leurs RNA (Figure 1). J'ai également conçu l'expérience pour démontrer l'effet spécifique des morpholinos (figure 2) et rédigé la partie du manuscrit qui décrit de ces expériences.

## 1. Abstract

How is the initial set of neurons correctly established during the development of the vertebrate central nervous system? In the embryo, glycine and GABA are depolarizing due to the immature chloride gradient, which is only reversed to become hyperpolarizing later in post-natal development. We previously showed that glycine regulates neurogenesis *via* paracrine signaling that promotes calcium transients in neural stem cells (NSCs) and their differentiation into interneurons within the spinal cord of the zebrafish embryo. However, the subjacent molecular mechanisms are not yet understood. Our previous work suggests that early neuronal progenitors were not differentiating correctly in the developing spinal cord. As a result, we aimed at identifying the downstream molecular mechanisms involved specifically in NSCs during glycine-dependent embryonic neurogenesis. Using a *gfap:GFP* transgenic line, we successfully purified NSCs by fluorescence-activated cell sorting (FACS) from whole zebrafish embryos and in embryos in which the glycine receptor was knocked down. The strength of this approach is that it focused on the NSC population while tackling the biological issue in an *in vivo* context in whole zebrafish embryos. After sequencing the transcriptome by RNA-sequencing, we analyzed the genes whose expression was changed upon disruption of glycine signaling and we confirmed the differential expression by independent RTqPCR assay. While over a thousand genes showed altered expression levels, through pathway analysis we identified 14 top candidate genes belonging to five different canonical signaling pathways (signaling by calcium, TGF-beta, sonic hedgehog, Wnt and p53-related apoptosis) that are likely to mediate the promotion of neurogenesis by glycine.

**KEYWORDS:** glycine; interneuron; neurogenesis; stem cell; zebrafish



## 2. Introduction

Neurogenesis is a crucial step in vertebrate development and it requires multiple and integrated signals throughout development to be achieved correctly (Urban and Guillemot, 2014, Mitrousis et al., 2015). Many factors have already been identified as regulators of neurogenesis in the spinal cord (Jessell, 2000) and glycine signalling has been recently shown to be one of those (McDearmid et al., 2006). In addition to being the smallest and the simplest of the essential amino acids, glycine is also a neurotransmitter involved in inhibitory circuits. With gamma-aminobutyric acid or GABA, they are the two major inhibitory neurotransmitters in the central nervous system, with glycine acting mainly in the brainstem and in the spinal cord.

During development, prior to glutamatergic innervation, neural activity mainly relies on glycinergic and GABAergic neurotransmission (Ben-Ari, 2002). Interestingly, although these neurotransmitters are mostly inhibitory in the adult neural system, they elicit an excitatory activity in the early embryo. Indeed, contrary to their hyperpolarizing role in adult neurons, GABA and glycine result in a chloride-induced membrane depolarization in the embryo, which generates the earliest forms of electrical signalling in the immature nervous system. This switch in the electrical activity of these neurotransmitters has been correlated with the late expression of the neuron-specific and extrusive chloride/potassium co-transporter 2 (KCC2), which decreases chloride load in mature neurons and therefore underlies the hyperpolarisation of the cell when the glycine receptors (GlyRs) open. In contrast, in embryonic neurons the chloride load is higher and glycine binding to GlyRs provokes a release of chloride ions and therefore induces a depolarization of the cell. This excitatory effect of glycine during embryonic development is necessary for a broad range of neurogenic processes from formation to maturation of neuronal circuits (Ben-Ari, 2002). Of particular interest, mutations of glycine signalling, such as mutations in GlyRs (Pilorge et al., 2015) and KCC2 (Merner et al., 2015), have recently been implicated in autism, arguably impacting on neurogenesis.

Previously, our group discovered an early role of glycine during neurogenesis in the spinal cord, which starts during the first day post-fertilization (dpf), prior to hatching after 2 dpf. Glycine acts to promote the differentiation of neural progenitors specifically into

interneurons (McDearmid et al., 2006) in a process that is impeded upon KCC2 expression (Reynolds et al., 2008). More recently, we showed that paracrine release of glycine is necessary and sufficient to drive correct interneuron differentiation (Cote and Drapeau, 2012) and that this involves calcium transients in neural progenitors (Brustein et al., 2013). Finally, our previous work showed that unlike in wild type embryos, proliferating neural progenitors in the spinal cord of embryos in which glycine signalling is impaired are still very numerous at later stages of development (i.e 3dpf) as they fail to differentiate (McDearmid et al., 2006, Cote and Drapeau, 2012). As a result, we concluded that glycine signalling is most likely to play a role in regulating the differentiation of early neural progenitors or neural stem cells (NSCs) into interneurons during spinal cord development

Although the requirement for glycine signalling for interneuron neurogenesis is now well established, the subjacent molecular mechanisms are not yet understood. In this work, we aimed at shedding light on the molecular action of glycine signalling during neural development and ultimately to identify the downstream molecular pathways involved. We took advantage of a *gfap:GFP* transgenic line in which NSCs are fluorescently labeled in order to develop a protocol to specifically purify the NSC population from whole embryos by fluorescence-activated cell sorting (FACS). After mRNA purification, we performed next generation sequencing to access the transcriptome of NSCs purified from embryos in which glycine signalling had been disrupted by morpholino knockdown. This allowed us to compare the set of genes differentially expressed in NSCs purified from *glra4a* morpholino-injected versus control morpholino-injected and non-injected zebrafish embryos and we confirmed their differential expression by independent RTqPCR assay. Using pathway analysis and clustering tools, we identified several canonical signalling pathways involved in glycine-dependent neurogenesis.

### **3. Materials and methods**

#### **3.1. Fish husbandry**

Wild-type zebrafish (*Danio rerio*) were reared at 28.5°C, kept under a 12-hour dark, 12-hour light cycle and staged as described previously (Kimmel et al., 1995). They were bred according to standard procedures (Westerfield, 1995). All experiments were performed in compliance with the guidelines of the Canadian Council for Animal Care and conducted at the “Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l’Université de Montréal” (CRCHUM).

#### **3.2. Microinjection**

A morpholino oligonucleotide targeting the *glra4a* glycine receptor (McDearmid et al., 2006) (using new GlyR nomenclature) was purchased from Gene-Tools and resuspended in ultrapure water at 1mM stock solution as recommended. A total of 0.6ng of morpholino was injected at the one-cell stage (5’-TGATAATGAGAGAGAAATGCGTCA-3’; ENSDART00000026194). For control knockdown, the same morpholino but harbouring five base mismatches was ordered and injected accordingly (5’-TcATAAT GAcAcAGAAATcCGTgA-3’; referred as control morpholino).

#### **3.3. Cloning of *Glra4a*:EGFP reporter constructs.**

Total RNA was isolated from 24 hpf zebrafish embryos using TRIZOL® reagent. 1µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA using VILO reverse transcription mix (Invitrogen). Primers were designed to flank the part of the 5’UTR/5’CDS of zebrafish *glra4a* gene containing the morpholino binding site targeted in this study. The resulting 0.1 kb segment was sub-cloned in-frame into *pEGFP-N1* to generate a fusion protein (primer sequences are available upon request). 30ng of *glra4a*-EGFP plasmid was microinjected with 0.6ng of *glra4a* or Control morpholino, respectively. The fluorescence was analyzed by confocal microscopy (Olympus BX61W1 equipped with a Quorum Technology spinning-disk confocal head) at 18 hpf.

#### **3.4. Single-cell dissociation and FACS**

Embryos at 20 hpf were briefly washed in calcium-free Ringer’s solution and deyolked by up and down pipetting. Deyolked embryos were pelleted by 500 x g centrifugation for

5min. They were briefly washed with FACSmax cell dissociation solution (Genlantis) and transferred in a 60mm petri dish with FACSmax solution, then incubated at 28.5°C. Single-cell dissociation was carefully monitored every 5 minutes and was generally achieved within 30min of incubation. Efficient dissociation was helped by firmly tapping the petri dish and by gentle pipetting. Single cells were exhaustively washed twice in cold PBS, pelleted and resuspended in 500µL of cold PBS. Single cells were filtered in a Falcon tube with a cell strainer cap (Fisher Scientific) and placed on ice until cell sorting. Sorting was performed using a BDARIA IIIu FACS with DIVA 8 software (BD Biosciences San Jose CA). GFP expressing cells were identified using a 488nm laser and a 530/30 BP filter. Cells were collected in cold PBS on ice.

### **3.5. Transcriptomic assay, differential expression assay and pathway analysis**

Two independent clutches were injected, by each of two experimenters, corresponding to experimental duplicates. Total RNA from RNAlater-fixed embryos was extracted using RNAsolv reagent (Omega Biotek) following the manufacturer's standard protocol. RNA extraction was made using between  $5.19-9.75 \times 10^5$  cells by RNAsolv reagent manufacturer's protocol (Omega Biotek). Absence of contamination with chemicals was assessed by nanodrop using 260/280 and 260/230 ratios. Quantification of total RNA was made by nanodrop and 0.1 to 1.44 µg of total RNA was used for sequencing. Quality of total RNA was assessed with the BioAnalyzer Nano (Agilent) and all samples had a RIN above 8.

Library preparation was done with the Truseq RNA (Illumina). 18 PCR cycles was required to amplify cDNA libraries. Libraries were quantified by nanodrop and BioAnalyzer. All libraries were diluted to 10 nM and normalized with the Miseq SR50 v2. Libraries were pooled to equimolar concentration and multiplexed by 6 samples per lane. Sequencing was performed with the Illumina Hiseq2000 using the SBS Reagent Kit v3 (100 cycles, paired-end) with 1.6 nM of the pooled library. Cluster density was targeted at around 800k clusters/mm<sup>2</sup>. Around 65 to 89 million reads were generated for each sample. Library preparation and sequencing was done at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Platform (Université de Montréal). About 86% of high quality reads were

mapped onto the zv9 version of the zebrafish genome (ensemble release 77) using TopHat version 2.0.10.

Differential gene expression analysis was assessed by DeSeq2 package using R software. Differential gene expression was filtered on an absolute value of LogFC > 1 and a False Discovery Rate (or adjusted p.value) > 0.05. Pathway analysis was performed using DAVID bioinformatics resources (Huang da et al., 2009). The list of differentially expressed genes was uploaded onto DAVID analysis wizard and a list of all expressed genes found in our dataset was used as a background for gene enrichment analysis. We also benefitted from a free trial of the Ingenuity Pathway Analysis software from QIAGEN. Pathway information was generated using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG: [www.genome.jp/kegg/pathway](http://www.genome.jp/kegg/pathway)).

### **3.6. Quantitative PCR**

qPCR primers for each tested gene were designed using the Universal Probe Library tool from Roche. Total RNA was extracted from FACS-purified NSCs using RNAsolv reagent (Omega Biotek) and chloroform followed by isopropanol precipitation. Reverse transcription was performed from 1 µg of total RNA using the superscript VILO reverse transcription mix (Invitrogen). Quantitative PCR was performed on 2 µL of 1:10-diluted cDNA using SYBR Green I master (Roche) on a LightCycler 80 thermocycler. Polr2d gene (ENSDART00000108718) was used as a reference gene for ddCt quantification.

## 4. Results

### 4.1. FACS-purification of NSCs from whole zebrafish embryos

In order to identify the signalling pathways involved in glycine-mediated NSC differentiation, we took advantage of the *gfap:GFP* transgenic line that has been reported to express GFP in NSCs. Using the *mi2001* allele (Bernardos and Raymond, 2006b), we were able to detect, as reported, fluorescence in the spinal cord from 20 hpf, near the beginning of neurogenesis and onwards. Since we aimed at studying the transcriptomic changes induced by GlyR knockdown specifically in NSCs, we set up a protocol to purify this population of cells from whole zebrafish embryos. As a result, we conserved the integrity of the embryonic *in vivo* context but in fine we only focused on our cells of interest. Using a protease cocktail (see material and methods), we successfully dissociated 20 hpf embryos into single cells and we were able to perform a FACS purification of GFP<sup>+</sup> cells (e.g NSCs) (Figure 1). As shown in Figure 1A, the quality of the single-cell dissociation was suitable for subsequent FACS with more than 50% healthy single cells. After doublet elimination and using a 530/30 BP filter, the GFP<sup>+</sup> population (i.e NSCs) was easily distinguishable from the negative batch as separate peaks in the cell count (Figure 1B). In order to prevent any contamination with GFP<sup>-</sup> cell types, we increased the stringency of the sorting by only selecting cells with a high GFP expression (>3,000 fluorescence units). Finally, to ensure the specificity of the sorting and the integrity of the purified cells, we performed a quality control by further analysing the GFP<sup>+</sup> sorted cells (Figure 1C, D). We found that about 81% of cells survived and more than 97% of them were GFP<sup>+</sup>. Together these results indicate that live NSCs can indeed be purified by FACS and so used to explore the neurogenic role of glycine.

### 4.2. Glycine receptor knock-down in NSCs

We used the same procedures to purify NSCs from (i) uninjected 18 hpf embryos, (ii) embryos injected with a 5 base-mismatch control morpholino and (iii) embryos knocked-down for GlyR using a specific *glra4a* morpholino (Figure 2A). To validate the *in vivo* efficacy and selectivity of our morpholino, we cloned a 0.1 kb fragment of the *glra4a* region containing the morpholino target site (in red in Figure 2B) in frame with the coding sequence of GFP. After co-injection of the corresponding mRNA and our control

morpholino, 92% of the embryos (n=49/53) depicted broad GFP fluorescence, thus validating the expression of the fusion protein (Figure 2C). However, when co-injected with *glra4a* morpholino, GFP was undetectable in 36 out of 38 of the injected embryos (95%). These results validate the selectivity of our *glra4a* morpholino compared to the 5 base- mismatch control morpholino. For each condition (uninjected, control and GlyR knockdown), we dissociated between 60 and 80 *gfap:GFP*<sup>+</sup> embryos from which we successfully FACS-purified between  $5.19-9.75 \times 10^5$  GFP<sup>+</sup> cells (Figure 2A). Each treatment condition was processed in duplicate from independent batches of eggs and total RNA was extracted reaching a RNA Integrity Number (RIN) higher than 8.50.

### **4.3. Deep-sequencing and differential expression analysis of purified NSCs**

Between 65 to 89 million high quality reads per condition were sequenced and we were able to map about 86% of these reads onto the *zv9* version of the zebrafish genome (ensemble release 77). Using DESeq2 algorithm, we assessed the differentially expressed genes comparing the dataset from GlyR knockdown NSCs with uninjected WT NSCs (test#1, Figure 3A) and found 6,971 differentially expressed genes (p.value>0.05).

We assumed that some of these genes could be misregulated because of the injection itself rather than being specific to the GlyR knockdown. To circumscribe this issue, we therefore performed a differential gene expression analysis in NSCs from control-morpholino injected embryos compared to uninjected (test#2). We found that 635 genes were misregulated in NSCs upon injection of the control morpholino (the full list of these genes is available upon request). Moreover, 402 of them were overlapping with the list of genes found to be differentially expressed upon GlyR knockdown (in blue in Figure 3A). Most likely, we assume that these genes (6%) are morpholino off-targets and were removed from further analysis. To this aim, we also ran a third differential analysis test (#3) comparing the GlyR knockdown dataset with control-morpholino knockdown. This analysis revealed that the expression of 215 genes from this overlapping list were not statistically different between GlyR and control knockdown. Thus, we considered these genes as off-targets and we removed them as well from the final list. However, we kept those genes whose differential expression between GlyR and control knockdown was

significant ( $p.value > 0.5$ ) since although being found in the control condition, the difference of expression for these genes seemed to be specific to GlyR knockdown (stripped blue in Figure 3A and highlighted in blue in Table 1).

We concluded that a total of 6,756 genes were specifically and differentially expressed in NSCs upon GlyR knockdown ( $p.value > 0.5$ ) and this number decreases to 1,162 after filtering with a  $|\logFC|$  greater than one (at least 2 fold up- or down-regulation; Table 1 and Figure 3B). As visualised in the volcano plot (Figure 3B), 77% of these genes were upregulated upon GlyR knockdown (895/1,162; green arrow up in Table 1) and 23 % were downregulated (267/1,162; red arrow down in Table 1). By filtering more stringently with a  $|\logFC| > 2$  (at least 4 fold up- or down-regulation), we could narrow down this number to 141 genes (dark red in Figure 3B).

#### **4.4. Identification of pathways involved in glycine-dependent neurogenesis**

Using the freely available DAVID bioinformatics resources (Huang da et al., 2009) and through orthologous extrapolation from the IPA software (Ingenuity Pathway Analysis, QIAGEN), we performed pathway analysis using our list of 1,162 specific genes differentially expressed in NSCs upon GlyR knockdown. To this aim, we used the KEGG annotation of identified pathways involving genes of our list. Interestingly, five main molecular pathways came out from this analysis as being enriched in our dataset (Figure 4A-E): signaling by (i) calcium, (ii) TGF-beta, (iii) sonic hedgehog, (iv) Wnt and (v) p53-related apoptosis. Regarding calcium signalling, we found CACNA2D4B and other calcium channels (CACNG1, CACNG8B and CACNB2B) to be upregulated. Consistently, upon GlyR knockdown, the ITPR1 intracellular calcium channel expressed at the endoplasmic reticulum was also upregulated. Besides, the expression of genes encoding the  $G\alpha_q$  GNA14 and the downstream phospholipases C (PLCD1A/4A), which activate ITPR1, were also upregulated in our dataset. Interestingly, we found that some calcium-dependent proteins such as calmodulin kinases CAMK2D1 and CAMK4, the proline-rich tyrosine kinase PTK2BB and the nitric oxide synthase 1 NOS1 were upregulated in NSCs upon GlyR knockdown. Finally, some transcription factors regulated by calmodulin



kinases and belonging to the CREB complex were downregulated in our dataset (ATF4B2, ATF7IP and ATF7A) (Figure 4A).

Furthermore, we found some genes involved in the Transcription Growth Factor TGF-beta signalling pathway such as Bone Morphogenetic Proteins 2B, 4 and 6, TGF-beta receptor 2 (TGFB2) and the TGF inhibitor Lefty1 (LFT1) as upregulated in our knockdown dataset (Figure 4B). In the same pathway, the transcription factor SMAD3A was found to be downregulated in response to GlyR knockdown in NSCs.

According to DAVID resources, BMP2B and BMP4 are also involved in Sonic HedgeHog signalling (Figure 4C) in which they are activated by GLI2B zinc-finger transcription factor (GLI-Kruppel family member 2B) and the expression of this gene was downregulated in our GlyR knockdown dataset. We also observed the upregulation of SHH1B gene itself and of the SHH interacting protein HHIP.

The fourth pathway identified is the WNT signalling pathway in which two inhibitor proteins WIF1 (Wnt inhibitory factor 1) and DKK1B (Dickkopf wnt inhibitor 1B) were upregulated upon GlyR knockdown (Figure 4D). Moreover, we found that the secreted frizzled-related protein 1a (SFRP1A) and the target transcription factor TCF7L1A were downregulated after GlyR knockdown. On the contrary, the expression of the leucine zipper FOS-like antigen 1A (FOSL1A) was upregulated in our dataset.

Lastly, we found p53 itself and numerous downstream targets of the p53-related apoptosis pathway (SESN1 and 3, CDKN1A, BAXA, GADD45AA and CASP8) to be activated upon GlyR knockdown, while SESN2 was downregulated (Figure 4E).

## 5. Discussion

In this work, we aimed at identifying the molecular mechanisms involved in glycine-dependent neurogenesis during embryonic development, precisely in NSCs. By specifically looking into these cells after GlyR gene knockdown, we identified five signalling pathways that are very likely to play a role downstream to glycine. One of the most interesting pathways that we found is calcium signalling. Its involvement is consistent with our previous work in which we found that glycine-induced calcium transients in neuronal progenitors are required for neurogenesis (Brustein et al., 2013). Our present work suggests that calcium homeostasis is affected in NSCs upon GlyR knockdown and it identified specific members of this pathway as key molecular factors involved. Interestingly, although many proteins involved in intracellular calcium release (membrane calcium channels, ITPR1) as well as downstream effectors (CAMK4) were upregulated, the final targets of the pathway (ATF family transcription factors) were downregulated. This shows the complexity of the interpretation of such a large dataset. However, one could speculate that upon GlyR gene knockdown, calcium transients are disrupted in NSCs and that a compensatory mechanism is set up in order to rescue the entry of calcium into the cells. Moreover, it would be very interesting to identify among our dataset the secondary target genes that are likely to be misregulated because of the reduced expression of CREB complex members (AFT4B2, ATF7IP, ATF7A). These genes are normally regulated by these transcription factors and could be involved in NSC fate differentiation that would explain the specific loss of the interneuron population in the spinal cord.

Three other signalling pathways identified (TGF-beta, WNT and SHH signalling) are also very good candidate since their implication in neurogenesis has been exhaustively reviewed (Faigle and Song, 2013, Aigner and Bogdahn, 2008, Mathieu et al., 2010, Varela-Nallar and Inestrosa, 2013, Urban and Guillemot, 2014). Indeed, the three of them are widely involved in embryonic and/or adult neurogenesis through modulation of cellular behaviours and their identification here helps confirm the usefulness of our progenitor FACS/RNAseq approach.

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are the largest subgroup of the TGFs and they have been involved in numerous biological processes from cell survival and proliferation to differentiation in particular during the development of the central nervous system (Liu and Niswander, 2005). They have been characterised as inhibitors of neurogenesis during early development as they promote the development of ectoderm tissue at the expense of neuronal fate (Wilson and Hemmati-Brivanlou, 1995). Furthermore, both noggin-mediated BMP inhibition and chemical BMP inhibition have been shown to promote proliferation of NSCs and therefore neurogenesis (Guo et al., 2011, Neely et al., 2012). However, the role played by BMPs is more complex in the adult brain where their blockade leads to the depletion of the stem cell niches, suggesting a role of BMPs in the maintenance of stemness and therefore of long-term adult neurogenesis (Mira et al., 2010). Our analysis indicates that BMP2B, BMP4 and BMP6 are all three upregulated in NSCs upon GlyR knockdown (Figure 5G, H). According to the literature, this finding would be consistent with an inhibition of neurogenesis. Moreover, SMAD3 transcription factor, a target of TGFs that is also a crucial player promoting neurogenesis in adult mice (Wang and Symes, 2010), is downregulated in our dataset (Figure 5I). Altogether, these results suggest that the abnormal neurogenesis induced by GlyR knockdown could be, at least in part, due to misregulation of TGF-related proteins.

SHH signalling is important for the patterning of the dorso-ventral neuron types within the developing neural tube where it promotes ventral identities (Rowitch and Kriegstein, 2010). Therefore, its modulation could more likely be involved in a shift in cell fate. Although we did not previously observe that the lack of interneuron population upon GlyR blockade was made at the expense of another neuronal cell population (Cote and Drapeau, 2012), we can speculate that SHH signalling could be involved in the differentiation process of this specific interneuron population. Indeed, SHH signalling has been reported as modulating NSC proliferation and therefore the generation of newborn olfactory interneurons from the adult sub ventricular zone (SVZ) in mammals (Palma et al., 2005).

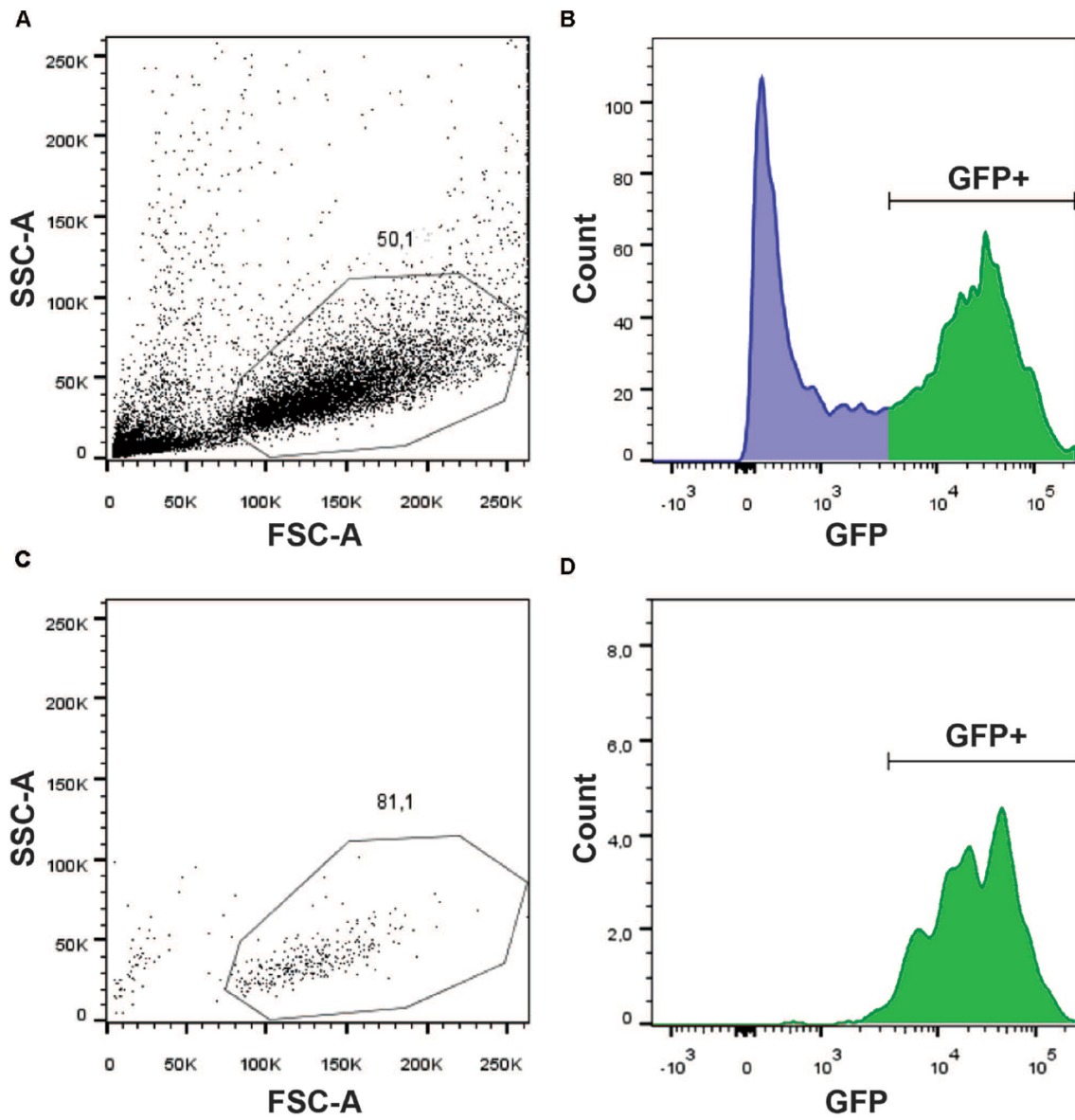
WNT signalling was shown as positively regulating neurogenesis in mammalian embryos (Kalani et al., 2008). Not only is it required for the generation of different types of neurons, but it also plays a role in the self-renewal properties of NSCs. Two inhibitors of the WNT pathway (WIF1 and DKK1B) were upregulated upon GlyR knockdown (Figure 5K, L), thus allowing us to assume that Wnt-dependent neurogenic processes could be silenced in NSCs when glycine signalling is impaired. Consistently, it has been reported that WNT inhibition through DKK1 overexpression prevents neuronal production during mouse embryonic neurogenesis (Munji et al., 2011). Moreover, the downstream target FOSL1A (upregulated in our dataset, Figure 5M) is a transcription factor regulating the expression of a broad panel of genes, some of them being necessary for cell proliferation although in endothelial cells (Evellin et al., 2013).

Even more interestingly, interactions between these signalling pathways have been recently shown to be requisite for stem cell differentiation. In fact, WNT and SHH pathways act downstream of TGF signalling to promote dopaminergic neuronal differentiation *in vitro* (Cai et al., 2013). Altogether, these data indicate WNT, SHH and TGF-beta signalling as top candidate pathways involved downstream of glycine to promote neurogenesis, though the molecular mechanisms involved could be more complex through the integration of multiple canonical pathways.

Lastly, our gene expression analysis identified P53 as being upregulated specifically upon GlyR knockdown (Figure 4, Figure 5N). Interestingly, P53 activation has been recently shown as regulating neurogenesis by increasing proliferation and differentiation of hippocampal NSCs *in vitro* (Grigor'eva and Glazova, 2015). However, P53 is better known as a pro-apoptotic factor, suggesting that NSCs might die in the absence of glycine signalling. Our previous work did not detect an increase in cell death in the developing spinal cord of morphants at 48 hpf (McDermid et al., 2006), although it could occur at the earlier stage examined here (18 hpf). P53 is often upregulated after injection of morpholinos, but our 5 base-mismatched control morpholino injection did not show any upregulation of p53 (Figure 5N). As a result, more discrete cell death could arise in a subpopulation of neural progenitors in the developing spinal cord.

The next step in deciphering the molecular aspects of glycine-dependent neurogenesis will be to perform functional genomics on the candidate genes we identified. Such a characterisation is beyond the scope of the present work as a large effort needs now to be deployed to understand the function of these molecular actors. Zebrafish would be a suitable model for such an analysis since the embryo is easily genetically accessible. Lastly, our present work widens the use of zebrafish as a model of developmental biology. Indeed, we took advantage of advanced cell purification techniques to precisely look within our cells of interest but without dismantling the *in vivo* context in which cells develop. As a result, zebrafish embryos can be considered as *in vivo* test tubes in which it becomes more and more easy to dig for molecular characterisation of phenotypes.

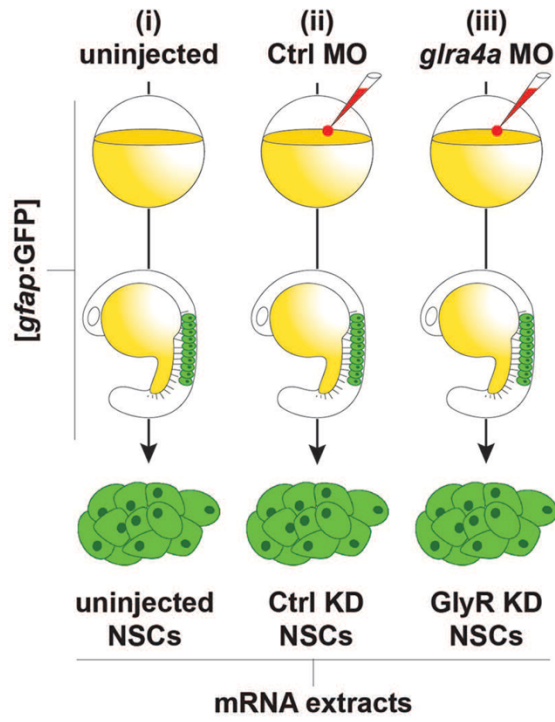
## 6. Figures and legends



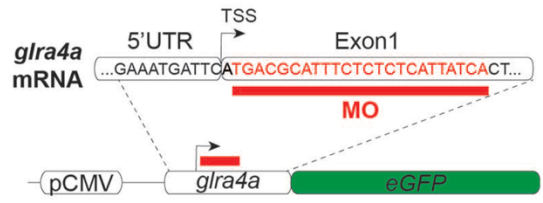
**Figure 1. Purification of GFP+ NSCs by FACS.**

Dissociated cells were analyzed on a BDARIA IIIu FACS and visualized according to their relative size (FCS, Forward Scatter) and granularity (SSC, Side Scatter) before (A) and after (C) cell sorting. About 50% of the events were dissociated cells suitable for sorting. GFP expressing cells were easily identifiable using a 530/30 filter (B). Sorted cells were analyzed post-sorting to confirm the selective and specific sorting of GFP+ cells (D).

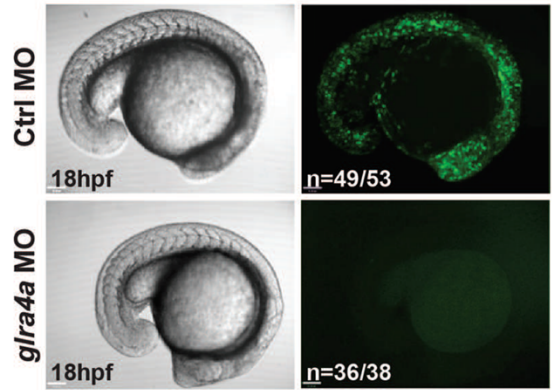
A



B



C

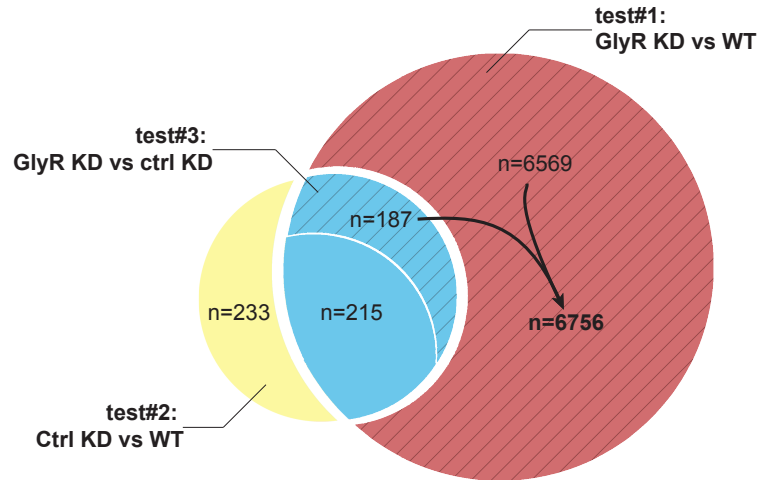




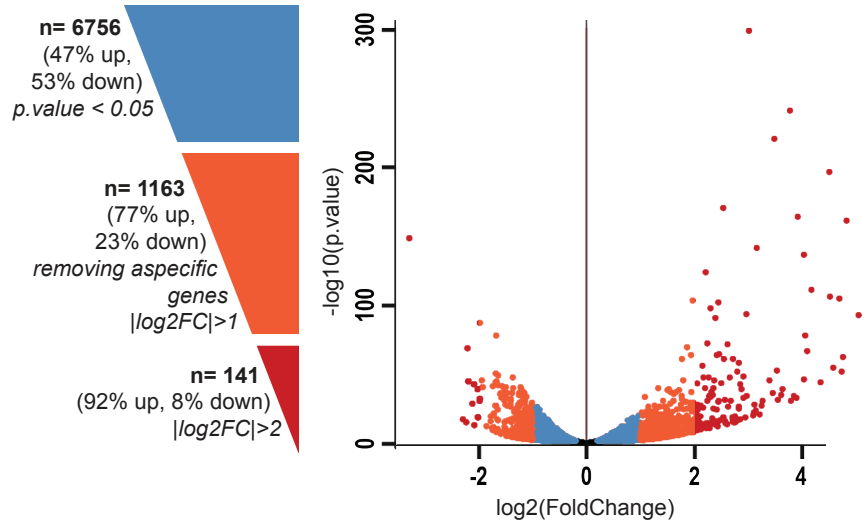
**Figure 2. Glycine receptor knock-down NSCs.**

**A**, Experimental protocol to purify NSCs from (i) uninjected, (ii) Ctrl MO-injected and (iii) *glra4a* MO-injected. *gfap*:GFP embryos were injected at the one-cell stage and let develop until 20 hpf. NSCs were sorted by FACS and harvested for total RNA extraction. **B**, *glra4a* morpholino targets 24 nucleotides (in red) downstream to the transcription starting site. A 100bp fragment encompassing the end of the 5'UTR and the 5' part of the first exon was cloned in frame with eGFP coding sequence downstream to the CMV promoter. **B**, Embryos co-injected with the *glra4a-eGFP* construct and Ctrl morpholino depict broad GFP fluorescence at 20 hpf (upper right). However, co-injection with *glra4a* morpholino abolishes fluorescence (lower right) thus validating the use of both Ctrl and *glra4a* morpholinos.

**A**

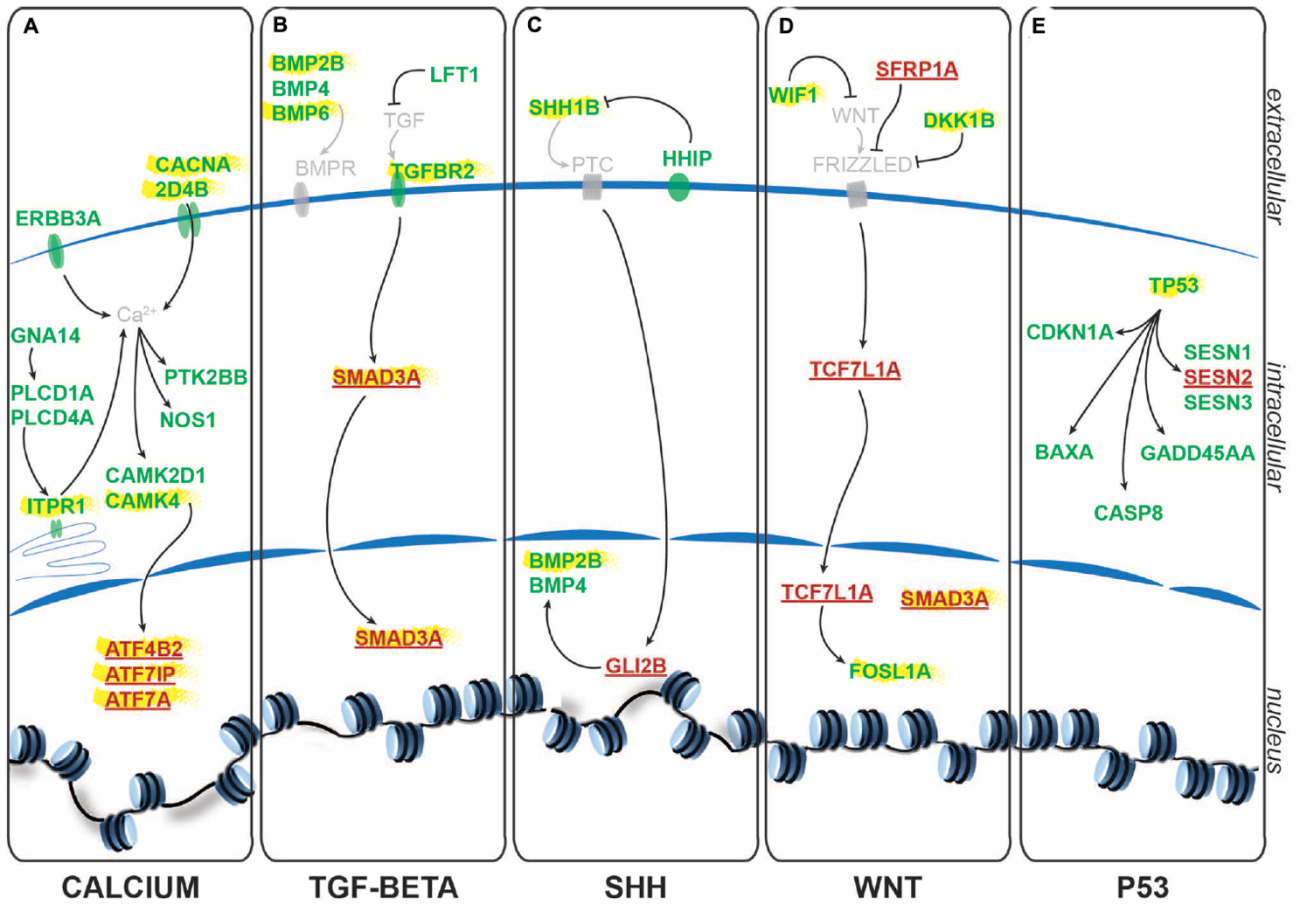


**B**

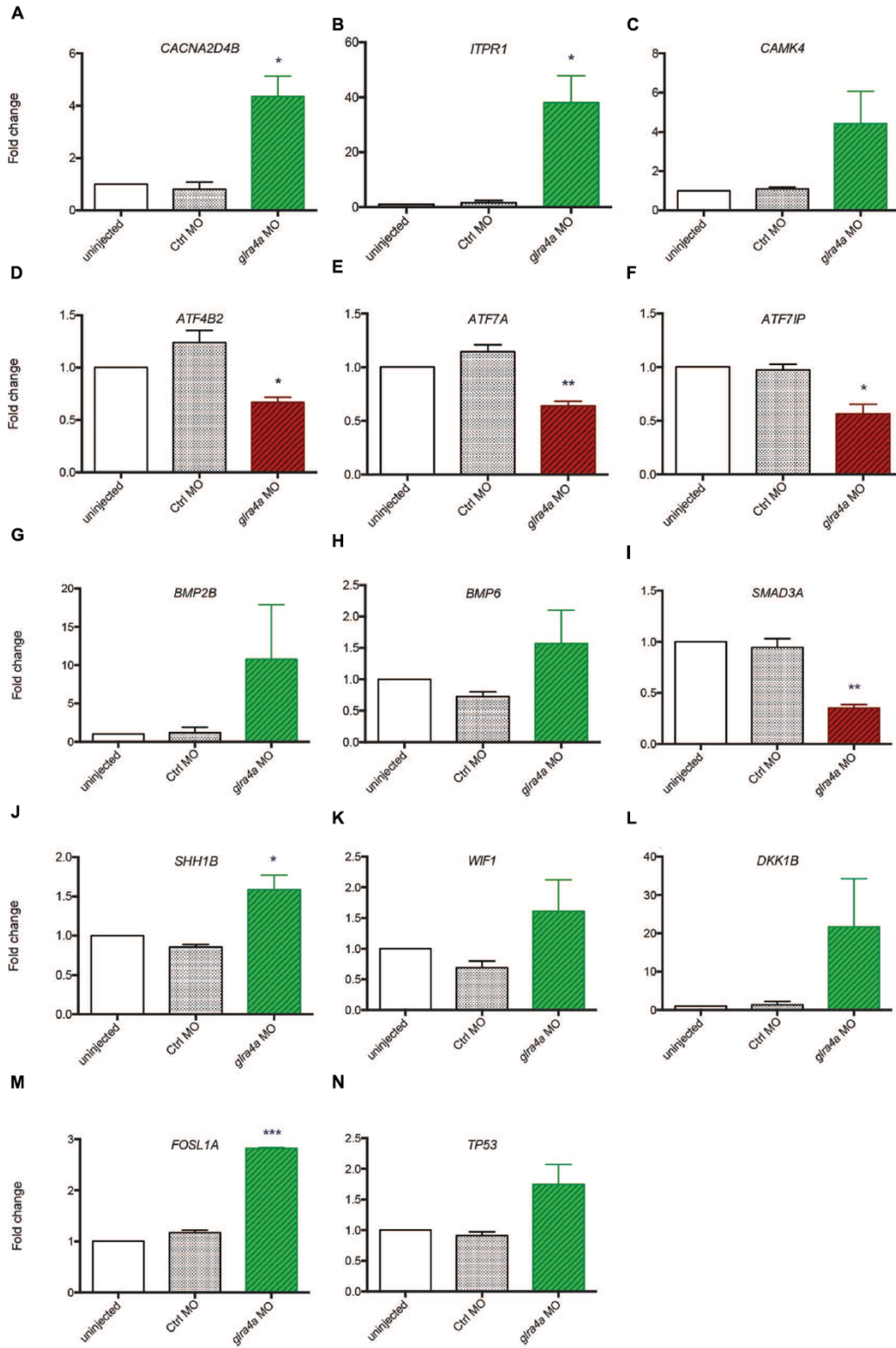


### Figure 3. Differential expression analysis.

**A**, Venn diagram showing the total number of differentially expressed genes in each tests. Test#1 identified a total of 6971 differentially expressed genes (6569+187+215, p.value < 0.05) by comparing the transcriptome of NSCs from *glra4a* morpholino-injected (GlyR KD) versus uninjected embryos (WT). Test#2 identified 635 differentially expressed genes between the transcriptome of NSCs from control morpholino-injected (Ctrl KD) versus uninjected (WT) (233+215+187, p.value < 0.05). 402 genes (215+187) were overlapping between tests #1 and #2 (in blue). Test#3 compared the transcriptome of GlyR KD versus Ctrl KD for these 402 genes and identified 187 genes for which the differential expression was significant (p.value < 0.05). These genes were compiled with 6569 genes differentially expressed in GlyR KD (in red) and compose the final list of 6756 specific genes differentially expressed in NSCs upon GlyR KD (stripped red). **B**, Volcano plot showing each of the 6756 genes from the final list established above. Blue dots represent the total 6756 specific genes filtered on a p value < 0.05. Orange dots show the 1162 genes with a  $|\log_2FC| > 1$  and red dots show the 141 genes with a  $|\log_2FC| > 2$ .



**Figure 4. Identified signalling pathways downstream to glycine in NSCs.** Representation of the pathways identified and of the key genes involved according to KEGG and IPA. For each signalling pathway (*A*) calcium, (*B*) TGF-beta, (*C*) SHH, (*D*) WNT and (*E*) P53, upregulated genes upon GlyR KD are noted in green and downregulated genes are in red. Genes highlighted in yellow have been tested by RT-qPCR to confirm RNA-sequencing data (see Figure 5).



**Figure 5. Validation of transcriptomic by RT-qPCR.**

A-N, The expression of 14 key genes from each signalling pathway identified were tested by RT-qPCR from independent experiments performed in duplicate: uninjected, Control MO (Ctl MO) and glra4a MO. One-way ANOVA statistical analysis was performed (\* p value < 0.05, \*\* p value < 0.01).

# CHAPITRE IV

Deuxième publication

## **Glycine Promotes the Survival of a Subpopulation of Neural Stem Cells**

**Bekri A.**<sup>1,2</sup>, Drapeau P.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

<sup>3</sup> Department of Neurosciences, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE – Front. Cell Dev. Biol., 11 July 2018



**Mise en contexte** — Cette deuxième étude est la continuation de celle effectuée dans le chapitre III. Le but de cette dernière est d’approfondir la compréhension des mécanismes moléculaires révélés dans le chapitre III. En effet, nous avons exploré une des voies de signalisation régulée par l’activité glycinergique, spécifiquement la perturbation de l’activité glycinergique qui induit une activation de la voie apoptotique p53. Nous confirmons cette régulation par différentes techniques, ensuite nous démontrons *in vivo*, par des techniques d’imagerie, l’effet de la perturbation de l’activité glycinergique sur la survie des CSNs incluant les sous-populations de ces dernières.

**Contribution** — Dans cette étude, j’ai conçu le plan général des expériences, exécuté les expériences, généré les résultats, rédigé le manuscrit, soumis le manuscrit et répondu aux questions/critiques des évaluateurs.

## 1. Abstract

Glycine is mainly known as an inhibitory neurotransmitter in adult mature neurons, regulating neuronal network activity in the central nervous system. In contrast, during embryogenesis glycine can act as an excitatory neurotransmitter and generates the first electrical signal in immature neurons. The roles and functional significance of this excitatory glycinergic activity during neurodevelopment are still unclear. Using the zebrafish embryo as a model, we previously showed that glycine regulates proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) to interneurons. Moreover, we identified that glycine signaling in NSCs is associated with several common developmental pathways and surprisingly also the p53-related apoptosis. Here we investigated how glycine signaling regulates NSC survival. First, we showed by two approaches, acridine orange staining and active caspase 3 immunostaining that defects in glycine signaling induce an early and transient cell death, which was suppressed by knockdown of p53. Then, we developed an NSC transplantation strategy to directly assess NSC-autonomous development upon perturbing glycine signaling. *In vivo* time-lapse imaging showed that disruption of glycine signaling disturbed the normal NSC interkinetic nuclear migration, leading to cell cycle arrest and apoptosis. Finally, we analyzed two main subpopulations of NSCs, expressing either nestin or GFAP, by *in situ* labeling and in transgenic lines expressing GFP in either population. We found that disruption of glycine signaling induced a drastic and selective loss of nestin-positive (nestin<sup>+</sup>) NSCs, which was only partially rescued upon p53 knockdown. Taken together, our findings support a role of glycine signaling in promoting survival of the nestin<sup>+</sup> NSC subpopulation early during development.

**KEYWORDS:** zebrafish, glycine signaling, NSCs, nestin, survival, neurogenesis.

## 2. Introduction

Glycine signaling plays a major role in the inhibition of mature neuronal circuits. In contrast, glycinergic activity in the embryo is excitatory and generates the first electrical signal in immature neurons and NSCs (Brustein et al., 2013, McCracken et al., 2017). This switch in glycinergic activity is due to the late expression of the potassium chloride co-transporter 2, or KCC2 (Ben-Ari, 2002). In humans, disruption of the excitatory/inhibitory balance leads to the dysfunction of cognitive processes (Mohler, 2009) and presents a common feature among different developmental and neurological disorders such as autism, epilepsy and hyperekplexia (Bode and Lynch, 2014, Eichler et al., 2008, Pilorge et al., 2016). However, many fundamental questions remain unanswered about the role of the switch in glycinergic activity in neurogenesis.

Neurogenesis is a dynamic process that is maintained by a precise balance of the cell cycle during division and differentiation of NSCs. This balance is regulated through an array of extrinsic and intrinsic molecular mechanisms (Schmidt et al., 2013). In an effort to investigate the roles of excitatory glycinergic activity during neurogenesis, we have used the zebrafish embryo as a model as it allows the disturbance of glycinergic activity by genetic and pharmacological approaches such as knockdown of the embryonic glycine receptor gene (GlyR) by anti-sense morpholino (MO) (McDermid et al., 2006), blocking glycinergic activity with the GlyR antagonist strychnine (Cote and Drapeau, 2012), or overexpressing KCC2 from the onset of embryogenesis to reverse glycinergic activity (Brustein et al., 2013). We reported that disruption of glycine signaling by all of these approaches induces a drastic reduction (by half) in the number of interneurons, accompanied by an increase in the number of proliferating cells as assayed by phospho-Histone 3 (pH3) immunostaining (Cote and Drapeau, 2012). We also showed that glycinergic activity regulates spontaneous calcium transients in Glial Fibrillary Acidic Protein positive (GFAP+) NSCs during embryonic development (Brustein et al., 2013). We therefore hypothesised that glycinergic activity plays an important role in neurogenesis by modulating NSC development.

In order to understand the molecular basis of NSC regulation by glycine signaling, we previously performed a transcriptomic analysis of the GFAP<sup>+</sup> NSC population upon

disrupting glycine signaling and our results highlighted five main pathways modulated by glycine signalling in NSCs, those for calcium, BMP, SHH, TGF-beta and the p53 pathway (Samarut et al., 2016). While the first four signalling pathways are well established in embryogenesis, modulation of the p53 pathway mediating apoptosis was to us a surprising result as little cell death normal occurs during zebrafish embryogenesis. To investigate the potential role of glycine signaling in NSC survival during development, we assayed apoptotic cells and found that disruption of glycinergic activity induced an early, transient loss of NSCs. Second, to directly assess at a cellular level the role of glycine signaling during neural development, we tracked NSC-autonomous glycinergic activity and showed that its disruption induced the loss specifically of the nestin<sup>+</sup> NSC subpopulation. In sum, we report that glycine signaling plays a crucial role during neuronal development by promoting the survival of the nestin<sup>+</sup> subpopulation of NSCs.

### **3. Materials and methods**

#### **3.1. Zebrafish**

Zebrafish (*Danio rerio*) were maintained at 28°C under a 12-h light/dark cycle in the CRCHUM Zebrafish Facility and they were raised and manipulated as per guidelines of the Canadian Council for Animal Care (Westerfield, 2007). Embryos were staged as described previously (Kimmel et al., 1995). The following genetic strains were used: *tg(-3.9nestin:GFP)* and *tg(GFAP:GFP)* (provided by Jana Maier – Karlsruhe Institute of Technology, Germany), *tg(HuC:Gal4)* (provided by Higashijima, Shin-ichi – Okazaki Institute for Integrative Bioscience, Japan).

#### **3.2. Microinjection**

Embryos at one cell stage were injected with MO (Gene tools), to knockdown a zebrafish embryo GlyR a4a subunit by Glr-MO, knockdown of p53 by p53-MO (Gene tools) and mismatched MO used as control (Ctrl-MO). Sequences of MOs were designed as previously described (Cote and Drapeau, 2012, McDearmid et al., 2006, Samarut et al., 2016)

#### **3.3. Apoptosis assay and cell death quantification**

To assay cell death, *in vivo* AO staining was performed in live embryos at 14, 20, 24 and 48 hours post-fertilization (hpf). The stock solution of AO (5 mg/ml, 300x) was diluted in egg water to 1X concentration. Then, embryos were dechorionated and incubated with AO (1X) in the dark for 10 minutes. The reaction was then stopped by washing the embryos several times with egg water and the embryos were imaged using a spinning-disk confocal microscope. Acquisition of images was performed with Velocity software (Perkin–Elmer). Cell death was quantified by counting AO-positives (AO<sup>+</sup>) cells in the first five somites of each zebrafish spinal cord. Statistics test was performed by one-way ANOVA analysis by compared the changing of the AO<sup>+</sup> cells numbers in the different conditions. In addition, cell death was confirmed by labeling aCas3. Embryos injected by Ctrl-MO or Glr-MO was fixed overnight at 20 or 24 hpf by 4% formaldehyde (4% PFA) at 4°C, then whole-mount immunohistochemistry was conducted as previously described (Sorrells et al., 2013). Primary antibodies rabbit anti-active Caspase-3 (Fisher Scientific, Cat. # BDB559565) was

used at (1:500 dilution). Then, secondary Alexa Fluor 488 anti-Rabbit IgG (Life Technologies, Cat. # A10042) was used at (1:2000 dilution).

### **3.4. Whole-mount in situ hybridization**

Embryos injected with Glr-MO or Ctrl-MO were dechorionated and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min each at room temperature and then fixed immediately overnight in cold 4% PFA at the desired stage. Embryos were then dehydrated in a gradient of methanol (25%, 50%, 75%, methanol in PBS) and transferred into 100% methanol and stored at -20 °C. The embryos were then hydrated by inverted gradients and loaded into sample holders and mounted into an *in situ* hybridization device (Folgentec-France). Embryos were subjected for 22 hours to a continuous stream (1.7 ml/min) of successive reagents following the *in situ* hybridization protocol as previously described (Bekri et al., 2014). Finally, enzymatic detection was performed in PM purple reagent (Roche) under constant observation.

### **3.5. Probes, cell labeling and transplantation**

To make probes for GFAP and nestin, total RNA was isolated from 24 hpf zebrafish embryos. Then, total mRNA was reverse transcribed to cDNA. A specific primers were designed to target around 1000 bp of nestin or GFAP RNAs according to previous descriptions (Thisse and Thisse, 2008). The sequences of primers used in synthesizing probes are as follows: nestin forward (F): 5'CCATGCAGCAAAGAGAAGAA-3', nestin reverse (Sp6-R):5'TAATACGACTCACTATAGGGTGTGACTTGTAGACACAGAACTGC3', GFAP (F): 5'GAGATCAATTCCTGAAGAAGGTC3' and GFAP (Sp6-R): 5'TAATACGACTCACTATAGGGCTGCACCGGAACAGTGATT3'. To label nuclei and cell membranes, sense strand-capped RNAs were synthesized by using SP6 transcription mMACHINE system (Ambion) from NotI-linearized plasmids including, pCS2-H2B-GFP, pCS2-H2B-RFP that expressed Histone 2B fused with GFP or RFP proteins which used as nucleic markers, or pCS2-CAAX-GFP that expressed farnesylated GFP which used as Membrane markers (kind gift from Jonathan DW Clarke, King's College London, UK) (Alexandre et al., 2010). Then, nuclei and cell membranes were labeled respectively by co-injection embryos with 150 ng of mRNAs encoding either fluorescent H2B fusion protein (H2B-RFP or H2B-GFP) and membrane marker (CAAX-GFP). Transplantation was performed as

previously described (Kemp et al., 2009). Donor embryos were co-injected at one-cell stage with the nuclear and membrane markers and Glr-MO or Ctrl-MO, following strategy in Figure. 3A-i. At the shield stage (6 hpf), 10 to 20 cells from each donor embryo were transplanted into the same wild type (wt) host embryo (Figure. 1A).

### **3.6. Confocal and time-lapse imaging.**

Host embryos were anesthetized with 0,03 % tricaine (MS222; Sigma) at 18 hpf and mounted in a small dish with 1.5% low-melting agarose (Sigma); the embryos were dorsally oriented so that marked cells located in the posterior hindbrain and spinal cord were facing up. Then, the dish with embryos was maintained at 28 °C using a heating plate system (Live Cell Instrument). Images were acquired using a Quorum Technologies spinning-disk confocal microscope with a 40X water-immersion objective. Time-lapse imaging was performed by taking a series of z stacks every five minutes during 10 hours. Data sets were analyzed with Volocity<sup>®</sup> software.

## 4. Results

### 4.1. Early, transient NSC survival defects upon disruption of glycine signaling.

As the zebrafish interneuron population is broadly reduced upon disruption of glycinergic activity (Cote and Drapeau, 2012, McDearmid et al., 2006), we hypothesized that it plays an early role during neurogenesis by regulating a common progenitor. Recently, we sorted by flow cytometry the GFAP<sup>+</sup> NSCs from zebrafish embryos and analyzed these by RNA-sequencing, which revealed that glycine regulates five main pathways in NSCs, including surprisingly the p53 pathways (Samarut et al., 2016). As cell death was not observed upon blocking glycinergic activity by a selective morpholino (Glr-MO) in zebrafish embryos when examined at a late stage of 48 hpf (McDearmid et al., 2006), more than a day following the onset of neuronal differentiation and just prior to hatching, we reasoned that glycine might affect survival of earlier NSCs.

To investigate this hypothesis, we first performed an *in vivo* time-course analysis of cell death by acridine orange (AO) staining. Surprisingly, we found that embryos injected with Glr-MO had a large number of AO<sup>+</sup> cells compared with embryos injected with control MO (Ctrl-MO) and these AO<sup>+</sup> cells were specifically located in the CNS (**Figure 1A**). To confirm these results, we performed another apoptosis assay based on detection by immunostaining of activated Caspase 3 (aCas3), which is known as a major mediator of programmed cell death (Taylor et al., 2008). As with the AO staining, we detected many aCas3 positive cells in the brain and spinal cord only upon disruption of glycine signaling (**Figure 1B**). Importantly, quantification of the number of AO<sup>+</sup> cells over four different time-points (14, 20, 24 and 48 hpf) showed a transient cell loss between 20 and 24 hpf compared with control embryos (approximately 4-folds). However, no significant cell death was noted at 14 and 48 hpf (**Figure 1C**). To verify whether cell death is related to overexpression of p53 as reported by Samarut et al. (2016), we down regulated p53 expression upon disruption glycine signaling by co-injecting p53-MO and Glr-MO in the same embryos, followed by a time-course analysis of cell death by AO staining. The results showed a significant reduction of cell death observed between 20 and 24 hpf upon



disrupting glycine signaling without any difference in cell death at 14 and 48 hpf (**Figure 1C**).

These results suggest that p53 signaling is related to cell death induced by glycine signaling disruption. These findings are in agreement with McDearmid et al. (2006) with regards to the absence of the cell death during late stages of zebrafish development (48 hpf) and related the p53 gene up-regulation observed by Samarut et al. (2016) at 20 hpf. Additionally, we reveal that glycine signaling disruption induces a transient cell death between 20-24 hpf at CNS. Taken together, these experiments demonstrated that disruption of glycine signaling induce a transient programmed cell death in the CNS which is related to overexpression of p53.

#### **4.2. Cell-autonomous NSC phenotype upon disruption of glycine signaling.**

Although our results show that defective glycine signaling induced cell death in the CNS, they do not demonstrate which kinds of neural cells are affected. To better clarify the role of glycine signaling at a cellular level during neural development, we developed an approach based on single-cell transplantation coupled with *in vivo* time-lapse confocal imaging. This approach allowed us (1) to determine the cell-autonomous activity of glycine signaling (2) define when and which kinds of neural cells are affected, and (3) compare control and knockdown cells in the same environment. To do so, we used as a donor embryo the *tg(HuC:Gal4,UAS:RFP)* line in which the pan-neuronal HuC/Elav3 promoter drives RFP expression (Kim et al., 1996). During the time lapse, mature neuronal fate was assigned if these cells expressed RFP in the cytoplasm and nuclei, or NSC fate if they did not express RFP, with an example shown in (**Supp. Figure 1A-B**).

As a first step, donor eggs from *tg(HuC:Gal4; UAS:RFP)* embryos were triply injected with Ctrl or Glr-MO, mRNA coding for the membrane marker (CAAX-GFP) and a nuclear marker (H2B-GFP or RFP) following to the strategy shown in **Figure 2A-i**. Accordingly, **control** donor embryos were injected with Ctrl-MO, mRNA coding for H2B-GFP and CAAX-GFP (**Ctrl-MO, GFP<sup>+</sup>, RFP<sup>-</sup>**), whereas **knockdown** donor embryos were injected with Glr-MO, mRNA coding for H2B-RFP and CAAX-GFP (**Glr-MO, GFP<sup>+</sup>, RFP<sup>+</sup>**).

Thus, control cells would have green nuclei whereas GlyR knockdown cells would have red nuclei and both would be delineated by green membranes. Second, at desired stages and according to the fate map described previously (Kimmel et al., 1990), donor cells from control and knockdown embryos were transplanted together into an area of host wt embryo fated to develop into the CNS (**Figure 2A-ii-iii**). Finally, at 18 hpf neuron development in wt hosts was recorded by confocal time-lapse imaging.

At 18 hpf, the host embryos showed that transplanted cells naturally migrated into the neural tube and developed into neuroepithelial/radial glial NSCs (**Figure 2B**). Time-point stacked images showed a large number of apoptotic bodies containing condensed DNA from cells with red nuclei, indicating that transplanted knockdown cells (**Glr-MO, GFP<sup>+</sup>, RFP<sup>+</sup>**) were dying (**Figure 2B, blue arrows**) compared to with control transplanted cells (**Ctrl-MO, GFP<sup>+</sup>, RFP<sup>-</sup>**), which continued to divide and gave rise to new daughter cells (**Figure 2C, top sequence, magenta arrows**). Quantification of NSC death revealed a dramatic increase of NSC death upon disruption of glycine signaling compared with control condition (more than 10-folds) (**Figure 2D**). Closer examination revealed that transplanted NSCs showed a normal internuclear kinetic movement (INM) in control NSCs (**Ctrl-MO, GFP<sup>+</sup>, RFP<sup>-</sup>**) followed by cell division (**Figure 2C, top sequence, magenta arrows**) (Gotz and Huttner, 2005), whereas some of the GlyR knockdown NSCs (**Glr-MO, GFP<sup>+</sup>, RFP<sup>+</sup>**) showed an arrested INM during mitotic G2-M phases (**Figure 2C, bottom sequence, asterisk**) followed by cell fragmentation to apoptotic bodies (**Figure 2C, bottom sequence, blue arrows**). To confirm the specific effect of glycine signaling to NSCs and rule-out a general toxicity of MO injections, both knockdown (**Glr-MO, GFP<sup>+</sup>, RFP<sup>+</sup>**) and control (**Ctrl-MO, GFP<sup>+</sup>, RFP<sup>-</sup>**) cells were transplanted into the area of the host wt embryo that gives rise to non-neural cells such as skin or yolk cells. The results showed a normal fate development of both transplanted cells as they gave rise to skin cells in the tail and yolk region (**Figure 2E**). Quantification of non-neural cell death showed no significant cell death in both conditions (**Figure 2F**). Thus the apoptotic effect of the GlyR-MO was selective for NSCs.

To verify that NSC death was independent of mRNA nuclear labeling, we switched the injection of H2B-GFP during knockdowns and H2B-RFP during control while keeping

the injection of CAAX-GFP mRNA as membrane makers in both conditions. The results revealed the same phenotype, with a large number of apoptotic bodies containing green nuclei which present in this case the GlyR knockdown condition compared with control condition which showed a normal development of NSCs with red nuclei (**Supp. Figure 1C**). As an additional control, we transplanted this GlyR knockdown NSCs with green nuclei in non-neuronal areas and observed normal development of cells in the skin without fragmentation to apoptotic bodies (**Supp. Figure 1D**). These results showed the independence of cell death from mRNA nuclear labelling and confirmed the specificity of NSC death upon glycine signaling disruption. Taken together, these findings demonstrate that glycine signaling plays a specific and major role in NSC survival as reduction of this activity leads to the loss kind of NSCs.

### **4.3. The nestin<sup>+</sup> NSC subpopulation is lost upon disruption of glycine signaling.**

To define which kind of NSC is lost when glycinergic activity is blocked, we analyzed the patterns of the expression of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) and neuroectodermal stem cell protein (nestin) as two main markers of NSC subpopulations (Kim et al., 2011, Wiese et al., 2004). In addition to being NSC markers, these proteins belong to the intermediate filament protein family, which plays a major role in the organization of cell structure and dynamics (Sanghvi-Shah and Weber, 2017). To examine these subpopulations, we used two different approaches: (1) whole-mount *in situ* hybridization and (2) double transgenic lines that express GFP and RFP in different cells.

To perform *in situ* labeling, specific anti-sense RNA probes targeting GFAP or nestin zebrafish mRNAs were designed and synthesized. Then, control and knockdown embryos at 15 and 24 hpf were fixed and processed for *in situ* hybridization. GFAP *in situ* labeling showed a broad GFAP-positive (GFAP<sup>+</sup>) sub-population in the neural tube during early stages of embryonic development (15 hpf) and we noted that they maintained their distribution in the CNS as they were located broadly in the spinal cord and brain at 24 hpf (**Figure 3A-i**). As well, GFAP<sup>+</sup> *in situ* labeling showed no difference between Ctrl and Glr-MO treated embryos at both 15 and 24 hpf stages (**Figure 3A-ii**). In contrast, *in situ* labeling with the nestin transcript demonstrated a different pattern than that for GFAP<sup>+</sup>

labeling as nestin<sup>+</sup> cells were detected only in the otic vesicle (OV) and were greatly reduced in the neural tube at 15 hpf. At 24 hpf, they were widely present in the brain and spinal cord (**Figure 4A-i**) of Ctrl-MO embryos. Importantly, Glr-MO treated embryos showed a drastic reduction of the nestin<sup>+</sup> subpopulation at in the OV and CNS at 15 and 24 hpf, compared with Ctrl-MO treated embryos which the nestin<sup>+</sup> subpopulation was unaffected (**Figure 4A-ii**).

To confirm our results, we examined the nestin and GFAP subpopulations in two double transgenic lines, *tg(GFAP:GFP;HuC:RFP)* and *tg(nestin:GFP;HuC:RFP)*. The GFP signal was used to follow the GFAP<sup>+</sup> or nestin<sup>+</sup> subpopulations and the RFP signal was used to follow the mature neuron population upon disruption of glycine signal. In accordance with the *in situ* labeling results, GFAP-GFP cells in the *tg(GFAP:GFP;HuC:RFP)* embryos were broadly present in the CNS at 24 and 48 hpf (**Figure 3B**) without significant difference between percentage of GFAP-GFP embryos treated by Ctrl or Glr-MO (Ctrl-MO: 93%, n=43; Glr-MO: 88%, n=50) (**Figure 3C**). However, the analysis of nestin-GFP cells using the *tg(3.9nestin:GFP;HuC:RFP)* embryos showed a drastic reduction at 24 and 48 hpf of percentage of nestin-GFP embryos treated by Glr-MO compared with Ctrl-MO (Ctrl-MO: 85%, n=104; Glr-MO: 4%, n=92) (**Figure 4B,C**), indicating a selective loss of the nestin<sup>+</sup> subpopulation upon disruption of glycine signaling. Furthermore, the analysis of RFP signal indicated a loss of mature neurons which confirming the previous reports McDermid et al. (2006) (**Figure 3B-ii, 4Bii**).

To verify whether down regulation of p53 overexpressed upon disruption of glycine signaling by p53-MO could rescue the nestin<sup>+</sup> subpopulation loss (Figure 1A-B), we co-injected p53-MO with Ctrl-MO or Glr-MO in the *tg(nestin:GFP;HuC:RFP)* and we analyzed nestin-GFP embryo. The results revealed no significant difference of nestin-GFP NSCs between Ctrl-MO and Ctrl-p53-MO (Ctrl-MO: 2%, n=104; Ctrl-p53-MO: 0%, n=102) (Figure 4C). Nonetheless, a partial rescuing by about 28% of nestin-GFP embryos was observed by co-injecting Glr-p53-MO compared with Glr-MO (Glr-MO: 86%, n=92; p53-Glr-MO: 58%, n=104). These suggest that p53 signaling is related to glycine signaling mechanism to maintain nestin<sup>+</sup> subpopulation survival. However, down regulation of p53 alone did not fully rescue the nestin<sup>+</sup> subpopulation upon disruption of glycine signaling,

which might be explained by the major effect that glycine signaling disruption caused on the other pathways as reported by Samarut et al. (2016), and which might contribute together to maintain nestin+ subpopulation survival *via* glycine signaling. Taken together, these finding demonstrate that glycine signaling play a role in NSC development by promoting survival of the nestin+ subpopulation.

## 5. Discussion

The neurotransmitter signaling has primarily been associated with the physiologic function of neurons. However, several reports have identified roles for neurotransmitters and their receptors in cell fate determination by modulating NSC proliferation or differentiation, including by  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), glutamate and dopamine neurotransmitters (Anjard and Loomis, 2006, Andang et al., 2008, Yoshimizu and Chaki, 2004, Baker et al., 2004). In this work, we investigated the role of glycine as how its action as an excitatory neurotransmitter and the functional significance of its switch in activity during embryonic neurodevelopment is still limited. We explored by cellular approaches the transcriptomic data reported previously on pathways modulated by glycine signaling in NSCs (Samarut et al., 2016). We revealed that disruption of glycine signaling induced an early and transient NSC death related to p53 signaling. Further, we demonstrated by cell transplantation that NSC autonomous glycine signal disruption led to defects in cell division and caused cell death. In addition, we revealed that unlike the GFAP<sup>+</sup> NSC subpopulation, glycine signaling was specially required for survival of the nestin<sup>+</sup> NSC subpopulation.

### 5.1. Glycine signaling suppresses programmed cell death in the CNS

We based our study on previous reports that disruption of glycinergic activity in early (20 hpf) embryonic development leads to overexpression of the apoptotic P53 gene (Samarut et al., 2016). This result was surprising as McDearmid et al. reported that no apoptotic neural death occurred at late (48 hpf) embryonic stages when glycine signaling was defective (McDearmid et al., 2006). To clarify the contradiction between these reports, we performed two different assays of cell death, AO staining and aCas3 immunostaining, at several developmental time points. Both approaches confirmed that glycine signaling controls the survival of NSCs at an early stage of development (20 hpf) as reported by Samarut et al. (Figure 1A-C). However, the time course of cell death as assayed by AO staining revealed that, unlike Ctrl-MO treated embryos which had few apoptotic cells, Glr-MO-treated embryos showed a transient time-window of cell death between 20 and 24 hpf of development and with no significant increase in cell death before (at 14 hpf) or later (48 hpf), as reported previously (McDearmid et al., 2006). Additionally, down regulation of

p53, which is overexpressed upon disruption of glycine signaling, partially reduced the cell death observed between 20 and 24 hpf. These results suggest that glycine signaling is required for NSC survival during a precise time-window of development and p53 signaling is related to cell death induced by glycine signaling disruption.

Several functional studies implicate GlyRs in developmental processes in the CNS and more broadly in other organs. In the immature retina, glycinergic activity influences the development of rod photoreceptors (Young and Cepko, 2004). Also, glycine signaling was found to control the proliferation of progenitor cells during corticogenesis (McDermid et al., 2006, Cote and Drapeau, 2012, Avila et al., 2014) and to promote the migration of cortical interneurons (Avila et al., 2013). However, its role in NSC survival is less well characterized. Several studies indicated that the chloride transporter KCC2 contributes to neuronal survival during and after toxic stress (Pellegrino et al., 2011, Allain et al., 2016). Likewise, in other organs glycine was reported reducing hepatic damage and improve the survival rate of endotoxemia mouse models by regulating TNF- $\alpha$  and IL-10 secretion (Bruck et al., 2003). Moreover, it was reported that in liver injury, glycine prevents apoptosis of sinusoidal endothelial cells under vascular endothelial growth factor (VEGF) deprivation (Zhang et al., 2000). Furthermore, administration of glycine improves survival in rat liver transplantation (Schemmer et al., 1999) and prevents apoptosis during mesenteric ischemia/perfusion injury by down-regulation of the death-inducing signals in rat models (Zhong et al., 2012). Thus, glycine appears to play ubiquitous roles in cell survival and differentiation.

To investigate glycine signaling, we previously validated three different approaches that yielded the same phenotype: KCC2 overexpression, strychnine agonists or anti-sense MO knockdown (Zhong et al., 2012, Samarut et al., 2016, McDermid et al., 2006, Cote and Drapeau, 2012, Brustein et al., 2013), and in this study we selected anti-sense MO knockdown for its reproducible and robust phenotype. To minimize potential off-target effects, we performed control experiments such as dose-response and use of mismatched anti-sense MO as a ctrl-MO. The ctrl-MO and Glr-MO were used at a very low level (0.6ng) and they did not cause a major morphological abnormality but rather a subtle but significant loss of NSC subpopulation. Then, we developed a cell transplantation strategy

to determine the NSC autonomy of glycine signaling. Both ctrl-MO and Glr-MO treated NSCs were transplanted together in the same host wt embryo to evaluate cell behavior in the same (non-autonomous) environment. Time-lapse recording showed a normal behavior of ctrl-MO treated NSCs, which divided by INM to yield two daughter progenitor cells and in some cases neurons (Alexandre et al., 2010) (**Figure 2**). In contrast many Glr-MO cells arrested during mitotic division and entered apoptosis (**Figure 2C**). These findings confirmed at cellular level the increased cell death observed by both AO or aCas3 staining in the CNS and showed that a cell-autonomous defect of glycine signaling induced NSCs to apoptosis before differentiating into neurons. In addition, we showed that disruption of glycinergic activity in non-neuronal cell does not induce apoptosis (**Figure 2E-F; Supp. Figure 1D**). Taken together, these findings confirm the specific survival role of glycine signaling for NSCs and rules-out an apoptotic effect caused by off target toxicity of the MO. Moreover, time-lapse imaging showed that disruption of glycine signaling induced an arrest of INM in NSCs at the G2/M mitosis phases (Gotz and Huttner, 2005) followed by cell death. These results confirmed the increased mitotic M-phase pH3 immunostaining showed previously (Cote and Drapeau, 2012).

## **5.2. Glycine signaling is required specifically for survival of nestin+ NSCs**

Because defects of glycine signaling result in NSC apoptosis, we hypothesized that a subpopulation of NSCs may require glycine signaling to survive. We selected nestin and GFAP as major markers of early embryonic NSCs to analyze these subpopulations. Both *in situ* hybridization and transgenic reporter analyses showed a drastic reduction in the number of nestin+ NSCs upon disruption of glycine signaling compared with the GFAP+ subpopulation, which appeared unaffected. Additionally, down regulation of p53 expression upon disruption of glycine signaling rescuing partially nestin+ NSCs. The nestin protein is a member of the intermediate filament protein family. During embryogenesis it has unequivocally been accepted as a marker of NSCs and used to study their proliferation, migration and differentiation. Functionally, nestin is involved in cytoskeleton dynamics such as maintaining cells shape and regulating cell motility (Rutka et al., 1999, Shi et al., 2016). However, nothing was known about the link between glycine signaling and nestin function. Immunocytochemical and electrophysiological studies of



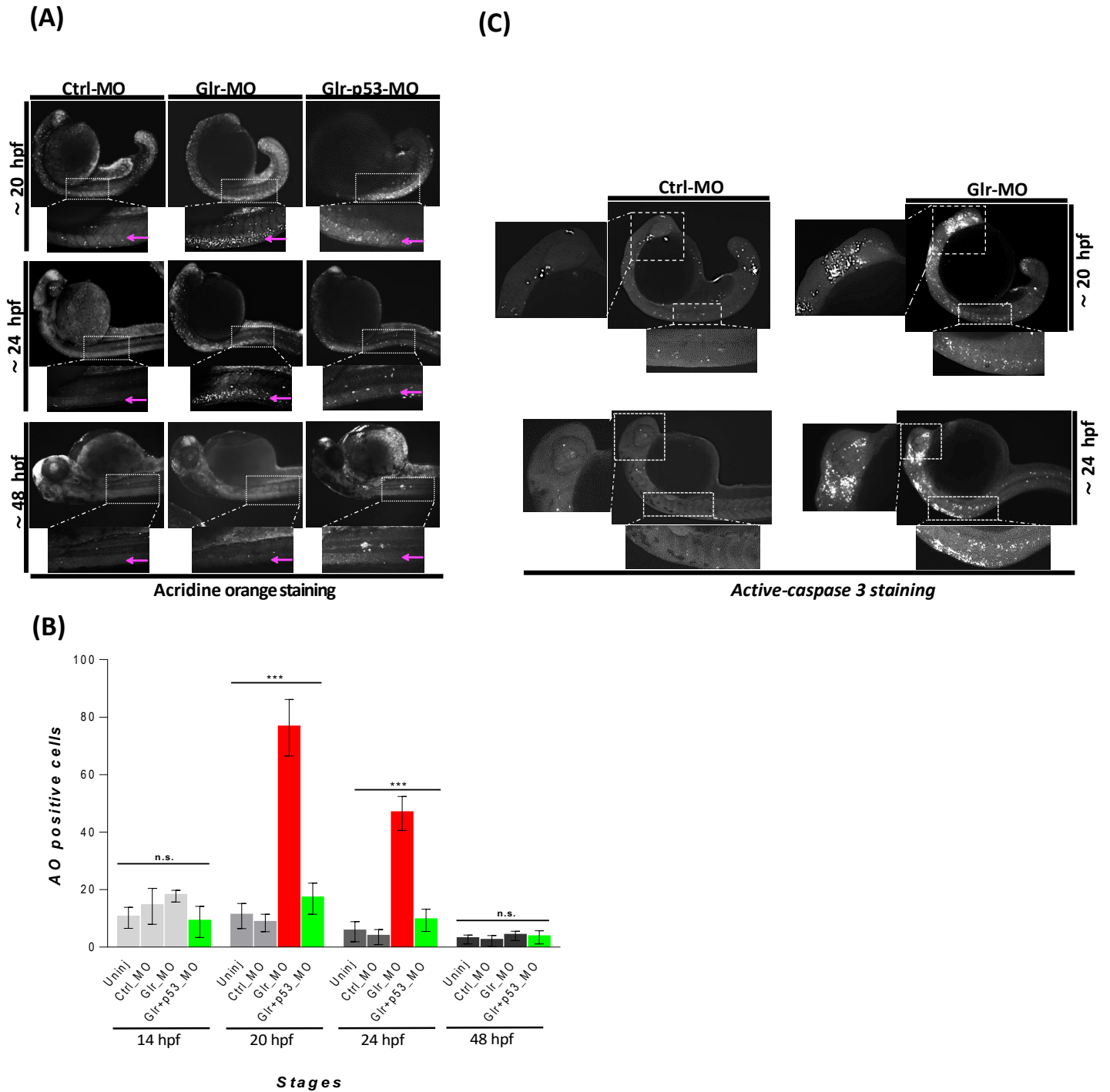
neurospheres derived from postnatal rat striata provided evidence of the presence of functional strychnine-sensitive GlyR in nestin<sup>+</sup> cells and suggest a possible developmental role of GlyR (Nguyen et al., 2002, Scain et al., 2010). Moreover, several *in vivo* studies performed in zebrafish and mouse models provide clear evidence involving nestin in survival and self-renewal of NSCs (Chen et al., 2010, Park et al., 2010). However, the mechanism by which nestin protects cell survival is still unclear. Recent studies reported that nestin interacts with cyclin-dependent kinase 5 and controls cell functions including apoptosis and cell differentiation (Cicero and Herrup, 2005, Sahlgren et al., 2006), and nestin deletion significantly inhibits the proliferation of colorectal cancer cells by arresting the cell cycle progression at S mitotic phase of division (Li et al., 2015). In support of this finding with nestin<sup>+</sup> NSCs, a recent study revealed connection between nestin and p53 into liver cancer cells, where they showed that p53-dependent nestin regulation in hepatocellular carcinomas and cholangiocarcinomas cells and this connection regulates cellular plasticity and tumorigenesis in liver cancer (Tschaharganeh et al., 2016).

In summary, our findings identify a developmental role of excitatory glycine signaling in the CNS. It plays a crucial role in survival of NSCs and maintains normal developmental proliferation. Importantly, unlike the GFAP<sup>+</sup> NSC subpopulation, the nestin<sup>+</sup> NSC subpopulation was particularly dependent on this activity. We conclude that excitatory glycine signaling helps the survival and proliferation of the nestin<sup>+</sup> NSC subpopulation as its deficiency leads to the cell cycle arrest and apoptosis of the nestin<sup>+</sup> subpopulation with a consequent loss of interneurons.

## 6. Acknowledgments

We warmly thank especially Meijiang Liao for useful technical advice and help. We are also very grateful to Jana Maier for the *tg(-3.9nestin:GFP)* and *tg(GFAP:GFP)* lines, Higashijima Shin-ichi for the *tg(HuC:Gal4)* line and Jonathan DW Clarke for the *pCS2-H2B-GFP*, *pCS2-H2B-RFP* and *pCS2-CAAX-GFP* constructs. Also, we thank Guy Laliberté and Marina Drits from CRCHUM zebrafish platform for their excellent zebrafish husbandry.

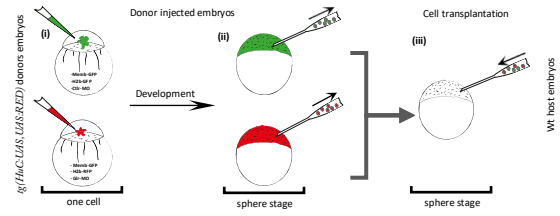
## 7. Figures and legends



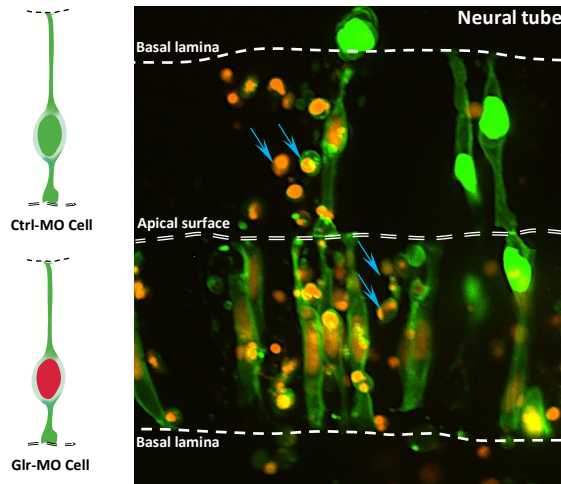
**Figure 1. Disruption of glycine signaling causes an early and transient neural cell death during embryonic development.**

(A) Lateral views of zebrafish embryos stained by AO. live embryos injected by Ctrl-MO, Glr-MO and p53-Glr-MO were stained by AO and imaged at 20, 24 and 48 hpf, higher magnification of cell death at spinal cord regions were highlighted in dotted boxed area. (B) Lateral view of zebrafish embryos at 20 and 24 hpf embryos injected by Glr-MO or Ctrl-MO and labeled by immunostaining for aCas3 (white dots), dotted box in the left and bottom showed a magnification of positives aCase3 in the brain and spinal cord. (C) Cell death quantification during zebrafish embryonic development. AO positive cells at the spinal cord were quantified and compared in each condition, uninjected, Ctrl-MO, Glr-MO and p53-Glr-MO injected embryos at four-time points, 14, 20, 24 and 48 hpf. One-way ANOVA statistical analysis was performed (n=15, \*\*\*\**p-value* < 0.0001)

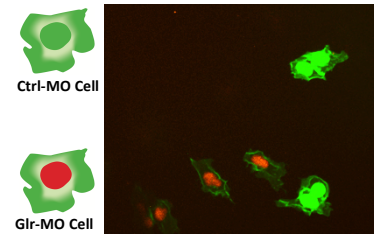
(A)



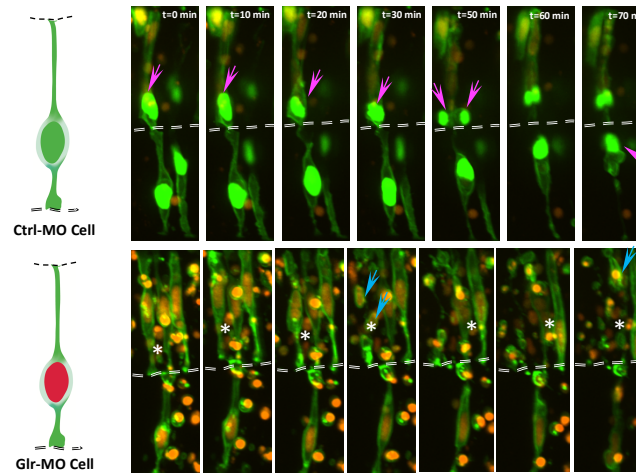
(B)



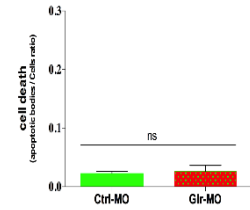
(E)



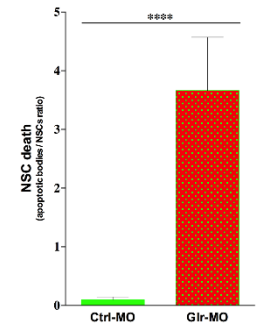
(C)



(F)

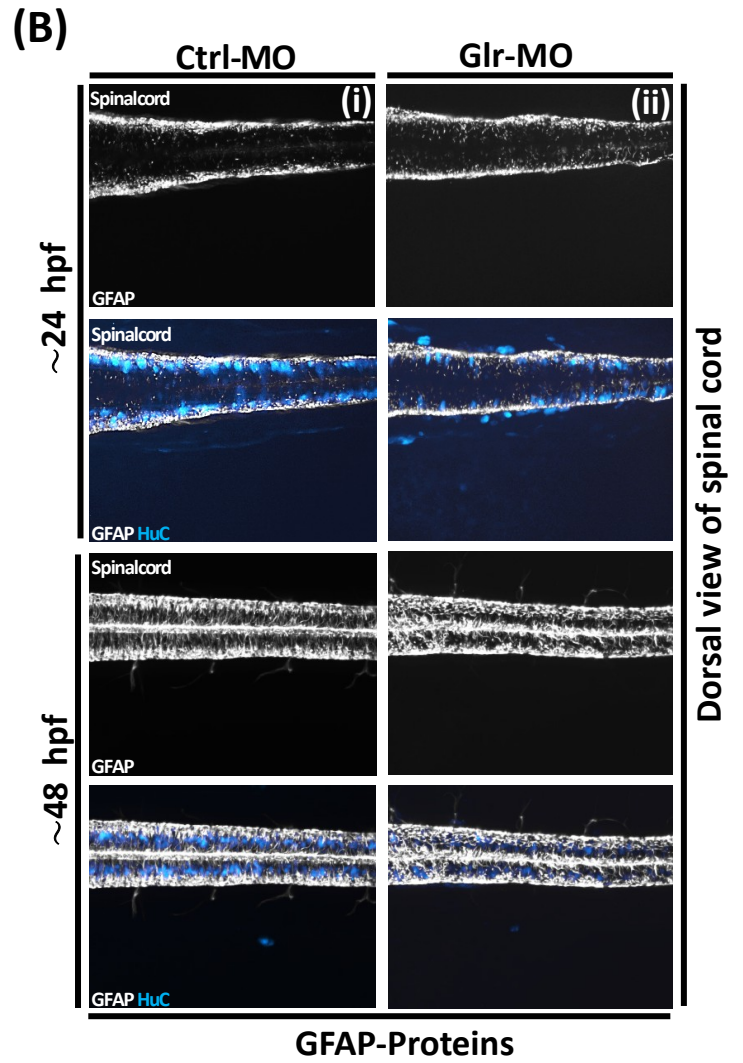
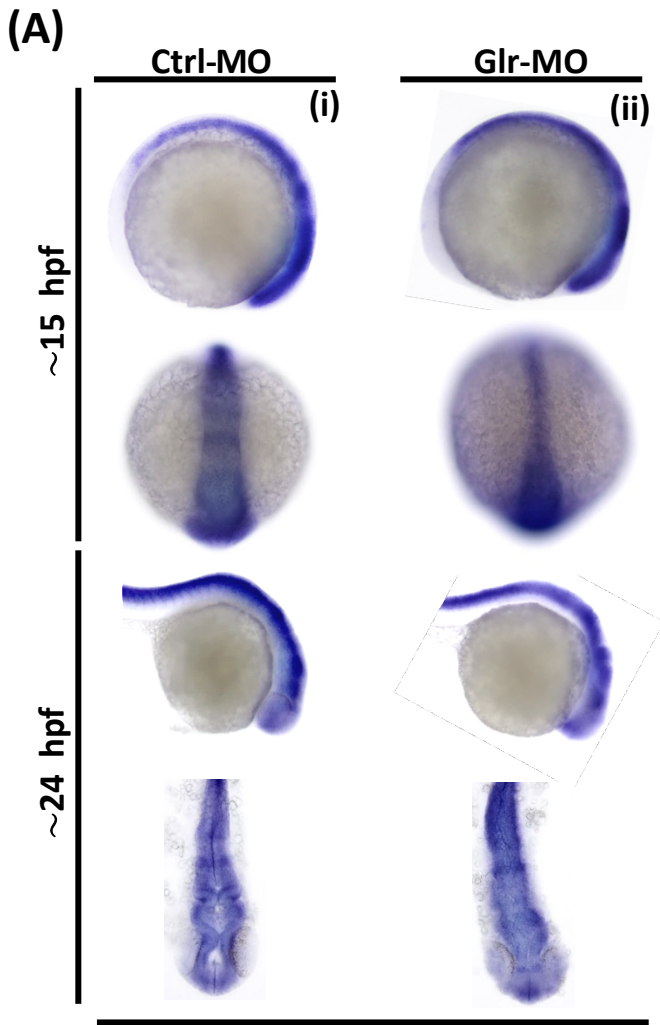


(D)

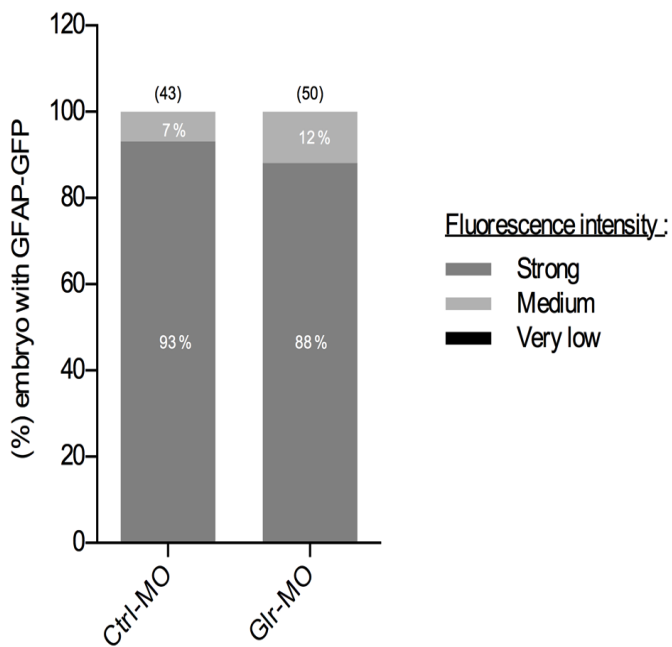


**Figure 2. Defects of cell-autonomous glycine signaling induce a specific NSCs loss.**

**(A)** Cell transplantation strategy. Donor *tg(HuC:Gal4,UAS:RFP)* was injected at one-cell by mRNA to target membrane, cell nucleus and Glr-MO or Ctrl-MO as indicated in step (i). At the sphere stage, cells from both conditions were transplanted together in the same host wt embryo in the blastoderm margin (ii) and (iii). **(B)** Confocal z-series images of transplanted NSCs. Ctrl-MO transplanted cells showed a normal development to NSCs (NSCs with green membranes and nuclei). However, a considerable of apoptotic bodies were observed in Glr-MO transplanted cells (NSCs with green membranes and red nuclei). The basal and apical surface are outlined by a dotted line and double lines respectively. **(C)** Live imaging revealed programmed death of NSCs upon glycine signal disruption. Selected frames from 2 hours time-lapse sequence of transplanted NSCs development showed a normal interkinetic nuclear migration of Ctrl-MO NSCs followed by cell division (top sequence, magenta arrows). In contrast, some of Glr-MO NSCs showed an arrest movement of interkinetic nuclear migration (bottom sequence, asterisk), followed by fragmentation of NSC to apoptotic bodies (bottom sequence, blue arrows). **(D)** Quantification of transplanted NSCs death (apoptotic bodies / NSC ratio) in both conditions, Glr-MO ( and Ctrl-MO reveal a drastic NSCs death upon disruption of glycine signaling by more than folds. **(E)** Disruption of glycine signaling does not affect non-neuronal cells survival. Transplanted Glr-MO cells (red nuclei) and Ctrl-MO cells (Green nuclei) were developed naturally to non-neural cells (skin) without showing apoptotic bodies formation. **(F)** Quantification of transplanted non-neural cell in both conditions, Glr-MO and Ctrl-MO reveal no significant cell death upon disruption of glycine signaling. t-test statistical analysis was performed (n=6, \*\*\*\*p-value < 0.0001)

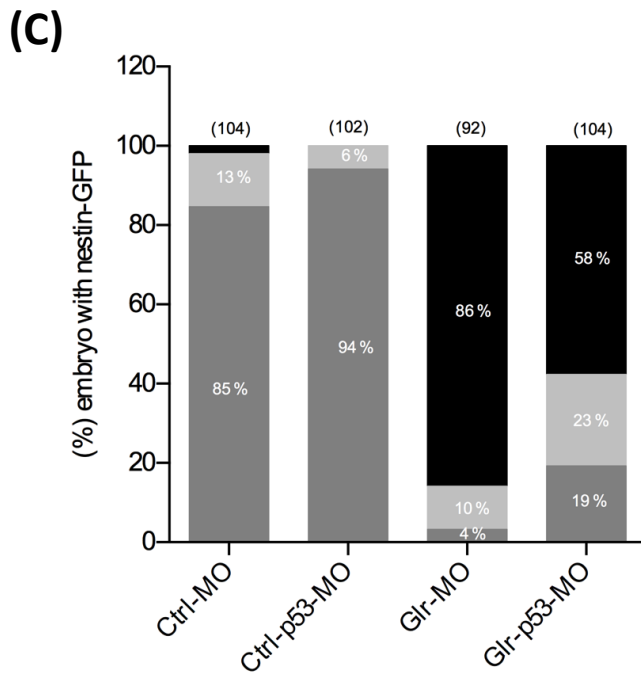
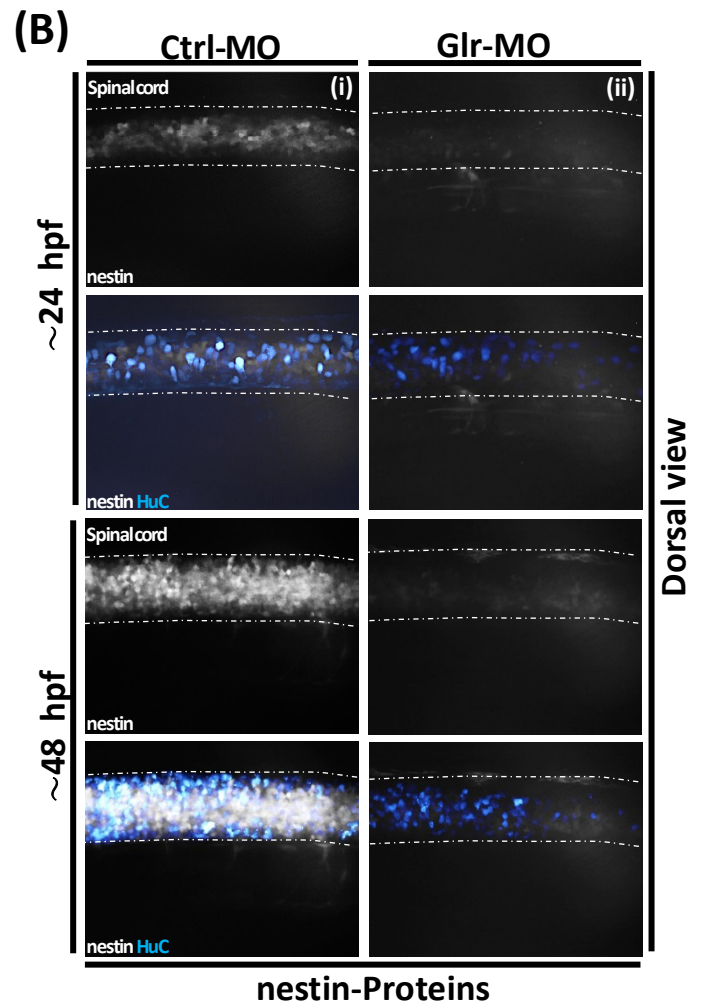
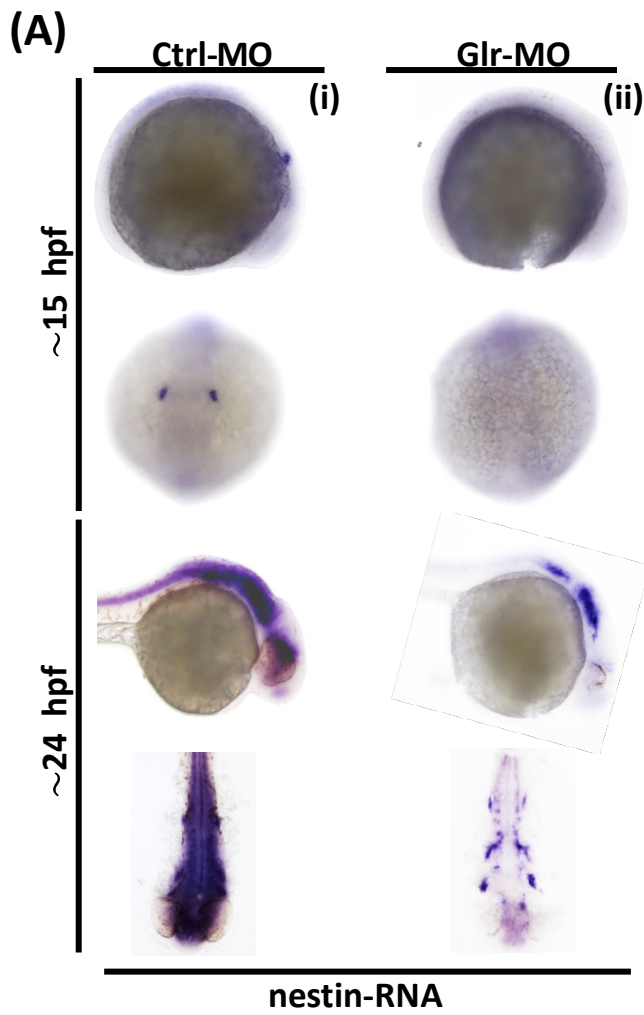


**(C)**      **GFAP-RNA**



**Figure 3. Glycine signaling defect does not affect GFAP<sup>+</sup> NSCs subpopulation.**

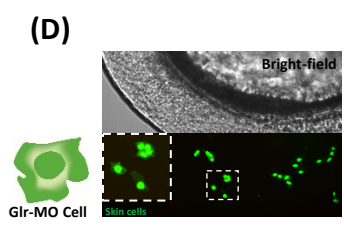
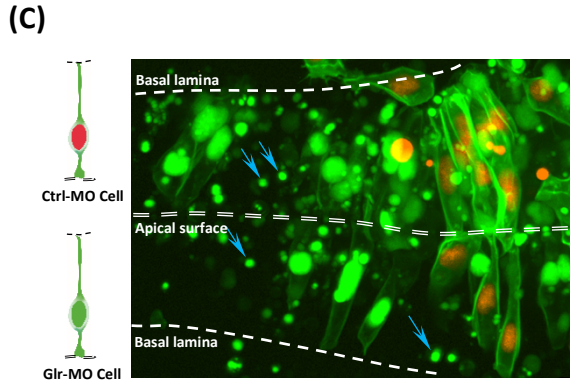
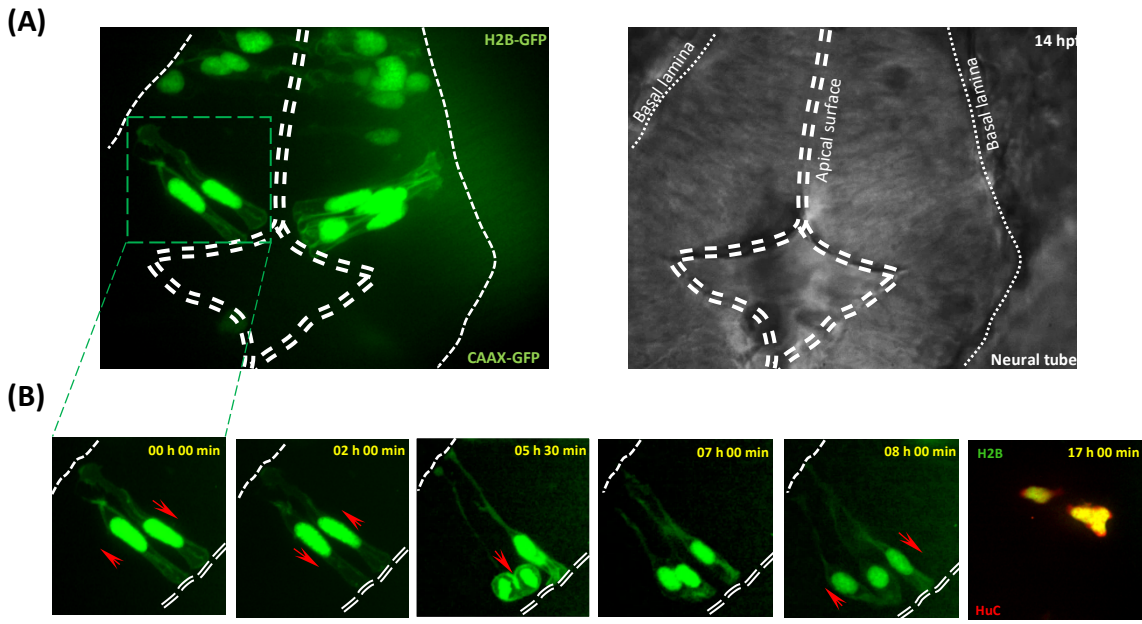
(A) Using GFAP as a marker of NSCs subpopulation, GFAP transcripts were analysed by whole-mount in situ hybridization. No major difference of GFAP<sup>+</sup> subpopulation was observed between Ctrl-MO (i), and Glr-MO (ii) conditions at 15 and 24 hpf. (B) Double tg(GFAP:GFP; HuC:RFP) line was used to analyze GFAP expression (white) and HuC<sup>+</sup> expression as mature neurons marker (Bleu). GFAP<sup>+</sup> signal does not change between Ctrl-MO (i) and Glr-MO (ii) conditions at 24 and 48 hpf. However, a clear decrease of HuC<sup>+</sup> signal was observed between Ctrl-MO (i), and Glr-MO (ii) conditions. (C) Quantification of GFAP-GFP embryos upon disruption of glycine signaling does not affect GFAP<sup>+</sup> subpopulation. For both ISH and IHC, n > 20 embryos per sample. IHC, immunohistochemistry; ISH, in situ hybridization.





**Figure 4. Glycine signaling defects induces a drastic loss of nestin<sup>+</sup> NSCs subpopulation.**

**(A)** Using nestin as a marker of NSCs subpopulation, nestin transcripts were analysed by whole-mount *in situ* hybridization. A drastic loss of nestin<sup>+</sup> subpopulation was observed between Ctrl-MO (i), and Glr-MO (ii) conditions at 15 and 24 hpf. **(B)** Double *tg(GFAP:GFP; HuC:RFP)* line was used to analyze nestin (white) and HuC<sup>+</sup> (Bleu) expressions. Major reduction of nestin<sup>+</sup> signals in Glr-MO conditions (ii) compared with Ctrl-MO (i) at 24 and 48 hpf. In addition to reduction of HuC<sup>+</sup> signals in Glr-MO condition (ii). **(C)** Quantification of nestin-GFP embryos upon disruption of glycine signaling reveal a drastic reduction of GFP signal compared with control. However, co-injecting of p53-MO and Glr-MO rescue partially nestin<sup>+</sup> subpopulation. For both ISH and IHC, n > 20 embryos per sample. IHC, immunohistochemistry; ISH, *in situ* hybridization.



**Supplementary figure 1. Development of transplanted NSCs.**

**(A)** Bright- field image of a dorsal view of neural tube of embryos at 14 hpf (Top panel-right), and transplanted NSCs expressing GFP in the membrane and nucleolus (Top panel-left). **(B)** Selected frames from 1 to 8h time-lapse sequence of two nearly adjacent transplanted NSCs, which divided after interleukin nucleus migration process (Red Arrow), and generating a neuron shown by RFP expression under HuC promoters (Bottom panel-left). **(C)** mRNA nuclei labeling does not affect survival of NSCs. Confocal z-series images of transplanted NSCs where Ctrl-MO transplanted cells showed a normal development to NSCs (NSCs with green membranes and red nuclei). However, a considerable of apoptotic bodies were observed in Glr-MO transplanted cells (NSCs with green membranes and nuclei). **(D)** Disruption of glycine signaling and mRNA nuclei labeling does not affect survival of non-neuronal. Bright-field image of a lateral view of tail in the top panel and confocal z-series images of Glr-MO cells (green nuclei) green membranes and nuclei in the bottom panel.

# CHAPITRE V

Troisième publication

## **Glycine Regulates Neural Stem Cell Proliferation During Development *via* Lnx1-Dependent Notch Signaling**

**Bekri A.**<sup>1,2</sup>, Liao M<sup>1</sup>, Drapeau P.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

<sup>3</sup> Department of Neurosciences, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada.

BRIEF RESEARCH REPORT ARTICLE –Front Mol Neurosci. 2019 Feb 18;12:44.

**Mise en contexte** — Ce dernier travail est basé sur des résultats obtenus précédemment dans le chapitre III. Ceci dit, la perturbation de l'activité glycinergique favorise une surexpression de *lnx1*. Le but de cette étude est d'explorer cette régulation par l'activité glycinergique. Nous avons utilisé plusieurs outils génétiques afin de disséquer le mécanisme moléculaire impliqué dans la voie de régulation glycine/*lnx1*. Nous avons également révélé certains mécanismes cellulaires qui sont régulés par la voie de signalisation glycine/*lnx1*. L'ensemble de ces résultats a été consistant avec ceux observés dans nos études précédentes et apporte plusieurs éléments à la compréhension de l'activité glycinergique dans les CSN.

**Contribution** — Dans cette étude, j'ai conçu le plan général des expériences, exécuté les expériences, généré les résultats, rédigé le manuscrit, soumis le manuscrit et répondu aux questions/critiques des évaluateurs.

## 1. Abstract

During development of the zebrafish embryo, glycine signaling promotes the differentiation of neural stem cells. We found that glycine signaling suppresses the expression of Ligand of Numb X1 (*lnx1*), a gene of unknown function during neural stem cell differentiation that is selectively expressed in the embryonic central nervous system. As a consequence, Numb levels were stabilised and Notch activity (measured as *her4.1* expression) was reduced, promoting neural stem cell differentiation. These consequent actions were blocked by knockdown of *lnx1*. In contrast, *lnx1* overexpression increased neural stem cell proliferation and led to defects of neural tube closure at early stage of development. Thus, our data provide evidence that glycine/*lnx1* signaling modulates neural stem cell proliferation by regulation of Notch signaling.

**KEYWORDS:** LNX1; NSCs; Notch activity; glycine signaling; neurogenesis

## 2. Introduction

During neuronal development an early spontaneous electrical activity is generated in NSCs as an essential step for their proliferation, migration and differentiation (Spitzer, 2006) and involves several neurotransmitters including glutamate, GABA and glycine (Demarque et al., 2002, Scain et al., 2010). Here we investigated the role of glycine signaling during neuronal development in the zebrafish embryo. We demonstrated previously that glycine signaling regulates NSC proliferation (McDermid et al., 2006) and differentiation (Cote and Drapeau, 2012) by promoting survival of a subpopulation of NSCs (Bekri and Drapeau, 2018). An RNA sequencing analysis revealed that glycine signaling regulates several pathways in NSC development (Samarut et al., 2016) as well as some outlying genes, with *lnx1* among the most affected.

*Lnx1* (Ligand of numb protein-x1) protein is a RING-type E3 ubiquitin ligase (de Bie and Ciechanover, 2011, Flynn et al., 2011) that degrades Numb (Dho et al., 1998), a cell fate determinant (Uemura et al., 1989). Furthermore, Numb is associated with Shh signaling (Di Marcotullio et al., 2011) and P53 signaling (Colaluca et al., 2008), both participating in glycine-dependent neurogenesis in zebrafish models (Bekri and Drapeau, 2018, Samarut et al., 2016). Importantly, Numb is well-known to be an inhibitor of Notch signaling (McGill et al., 2009, Roegiers and Jan, 2004), but how Notch and *lnx1* activity correlates with other pathways to fine-tune neuronal development is still not completely elucidated.

We report that glycine signaling suppressed *lnx1* expression in NSCs and consequently modulated Notch activity by controlling Numb protein degradation.

### **3. Materials and methods**

More information about materials and methods is provided in Supplementary Materials.

#### **3.1. Zebrafish**

Zebrafish (*Danio rerio*) were maintained at 28°C under a 12-h light/dark cycle in the crCHUM Zebrafish Facility and manipulated as per guidelines of the Canadian Council for Animal Care and protocol approved (N15018PDz) by the crCHUM ethics committee. To knockdown gene expression, embryos were microinjected with morpholino as described previously (Bekri and Drapeau, 2018).

#### **3.2. FACS and RT-qPCR.**

*Tg(GFAP:GFP)* embryos were injected with Glr-MO or Ctrl-MO. At 20 hpf, GFAP-NSCs were sorted by FACS. Then, total RNA was extracted and gene expression was quantified as described previously (Samarut et al., 2016). Sequence of each primer was designed by Snapgene software®.

#### **3.3. Whole-mount in situ hybridization and immunostaining.**

Embryos were injected with Glr-MO or Ctrl-M. Then subjected to *in situ* hybridization or immunostaining as described previously (Bekri and Drapeau, 2018).

#### **3.4. Western blotting.**

Embryos were injected with *lnx1-6myc* or *gal4* mRNA, then total protein was extracted at desired stages. Western blotting was performed as previously described (Swaminathan et al., 2018).

#### **3.5. Probes and mRNA synthesis.**

To make probes or mRNA, total RNA was extracted from 24 hours post fertilization (hpf) of zebrafish embryos. Total RNA was reverse transcribed to cDNA. Then, used to make probes and *lnx1* full length as described previously (Brustein et al., 2013)



## 4. Results

### 4.1. Glycine signaling suppresses *lnx1* expression and regulates neural tube development.

We identified that expression of *lnx1* was strongly suppressed by glycine signaling during zebrafish development (Samarut et al., 2016). To confirm our transcriptomic study, we analysed the expression level of *lnx1* upon disruption of glycine signaling by RT-qPCR and *in situ* hybridization. We used the tg(GFAP:GFP) line that expresses GFP under the *gfap* promoter (Bernardos and Raymond, 2006a), which is an early marker of NSCs. Embryos from this line were treated with a glycine receptor morpholino (Glr-MO) to disturb glycine signaling, or with control Ctrl-MO or in uninjected eggs as control conditions. Embryos at 18 hpf were dissociated and GFP+ NSCs were sorted, total RNA was extracted and *lnx1* expression was analysed by RT-qPCR. Disruption of glycine signaling confirmed a significant increase of *lnx1* expression compared with Ctrl-MO or uninjected embryos condition (Figure 1A). To further validate these results, *lnx1* expression was visualized by whole-mount *in situ* hybridization, revealing a strong expression of *lnx1* upon Glr knockdown especially in the central nervous system (CNS) at 18 and 24 hpf stages (Figure 1B; right side, asterisk), compared with control condition which showed only a slight expression of *lnx1* in the brain (Figure 1B; left side). Taken together, these results confirm that glycine signaling suppresses *lnx1* expression into NSC at early stage of development.

We next tested the effects of early overexpression of *lnx1*. Firstly, due to the unavailability of efficient antibodies against *lnx1*, we made a construct which expressed *lnx1* with myc-tag (*Lnx1-myc*) to reveal *lnx1* expression by myc-tag antibodies. Then, we overexpressed *Lnx1* by injecting *lnx1-myc* mRNA. Results showed a low expression level at 3 hpf and strong expression at 6 hpf, followed by degradation from 12 to 18 hpf until 24 hpf (midway through embryonic development), when *Lnx1* expression was no longer detected (Figure. 1C). Based on these results, we defined 18 hpf, near the start of neurogenesis, as the best time point to analyse the effect of early *lnx1* expression on zebrafish development. Control embryos showed normal brain and neural tube development (Figure 1D, in the top), whereas those injected with *lnx1* mRNA showed a

major defect of neural tube closure, especially during head development (Figure 1D, in the middle and bottom, asterisk). We then tested several doses of *lnx1* mRNA and determined that 40 pg was the lowest dose that consistently produced an effect. We classified the defective neural tube phenotype into three classes: normal, abnormal and severe (Figure 1D). Control embryos uninjected or injected with GFP mRNA or *Lnx1*-MO showed normal development of the neural tube (Figure 1E). However, upon *lnx1* mRNA injection many of the embryos showed defective neural tube closure (Figure 1E). To verify whether the defect of neural tube closure was caused by overexpression of *lnx1* and not an artifact caused by toxicity of mRNA injections, we tested for rescue of the defect of neural tube closure by co-injection of *lnx1* mRNA with *lnx1*-MO to block translation of *lnx1* mRNA. The results revealed a partial rescue, with a doubling of the normal phenotype and reduction by half in the two classes of defective phenotypes (Figure 1E). Taken together, these results provide evidence that overexpression of *lnx1* induced a defect of neural tube closure, accruing in a major malformation of the head region during zebrafish embryogenesis.

#### **4.2. Glycine/*lnx1* signaling regulates Notch activity and NSCs proliferation.**

*Lnx1/2* are E3 ubiquitin ligases which promote the degradation of Numb and modulate Numb/Notch signaling during neurogenesis (Kageyama et al., 2007, Nie et al., 2002), though the role of *Lnx1* in NSCs is unknown. To test whether disruption of glycine signaling in zebrafish NSCs, with elevated *lnx1* expression (Figure. 1), modulates Notch signaling, we injected *Tg(gfap:GFP)* embryos at the one-cell stage with *Glr*-MO or *Ctrl*-MO, then at 18 hpf GFAP<sup>+</sup>-NSCs were sorted and RNA was extracted. Using RT-qPCR we quantified *her4.1* expression, a reporter of Notch activity in zebrafish (Takke et al., 1999). The results showed a significant increase of *her4.1* expression in GFAP<sup>+</sup>-NSCs upon glycine disruption, compared with uninjected and *Ctrl*-MO controls conditions (Figure 2A). This suggests that disruption of glycine signaling promotes Notch activity in NSCs.

We hypothesised that disruption of glycine signaling could modulate Numb protein expression, the main mediator between *Lnx* and Notch signaling (Nie et al., 2002). We

therefore used total RNA extracted from GFAP<sup>+</sup>-NSCs upon glycine signaling disruption to quantify numb expression by RT-qPCR. The results showed no significant change in *numb* mRNA level between disruption of glycine signaling (Glr-MO) and control conditions (Glr-MO or uninjected embryos) in NSCs (Figure 2B). However, analysis of Numb protein expression by western blot using anti-Numb antibody revealed a decrease in Numb protein level upon disruption of glycine signaling (Glr-MO) compared with control condition (Ctrl-MO) (Figure 2C). This result suggests that while the *numb* mRNA level was unaffected by disruption of glycine signaling, Numb protein was degraded, likely *via* up-regulation of *lnx1* expression. To confirm that overexpression of *lnx1* in zebrafish embryos could mimic the disruption of glycine signaling and degrade Numb protein expression, we overexpressed *lnx1* and analyzed Numb protein expression at 18 hpf. The results showed an important decrease of Numb protein (Figure 2C). Finally, to verify whether degradation of Numb protein by glycine signaling was due specifically to *lnx1* overexpression, we tested whether down regulation of *lnx1* upon disruption of glycine signaling rescued Numb expression. To do so, we injected embryos with Glr-MO, *Lnx1*-MO or both Glr-MO and *Lnx1*-MO and evaluated Numb protein expression in each condition compared with uninjected embryos. The results showed a significant reduction of Numb protein level upon disruption of glycine signaling by Glr-MO compared with control whereas co-injection of Glr-MO and *Lnx1*-MO together rescued the Numb protein level (Figure 2D). These results provide evidence that glycine/*Lnx1* signaling modulates Notch activity by controlling Numb protein degradation in NSCs.

By analogy to *Lnx2* (Won et al., 2015, Yin et al., 2015), we hypothesized that glycine/*lnx1* signaling controls NSC proliferation and that its disruption would cause a developmental phenotype with stabilised NSCs. To test this hypothesis, we expressed *lnx1* specifically in NSCs by generating a stable zebrafish line expressing *lnx1* (*UAS:lnx1*) in the *Tg(UAS:RFP)* reporter background, thus generating the double-*Tg(UAS:lnx1;UAS:RFP)* effector-line (Figure Supp. 1.A). First, to validate the transcriptional activation of *lnx1* in the *Tg(UAS:lnx1;UAS:RFP)* line, we induced ubiquitous expression of *lnx1* by injections of Gal4-activator mRNA (20 pg) into *Tg(UAS:lnx1;UAS:RFP)* or *Tg(UAS:RFP)* embryos, with the latter as controls. At 18 hpf, neural tube development was evaluated and *lnx1* mRNA level was analyzed by semi-

quantitative RT-qPCR. The results showed a drastic defect of neural tube closure in *Tg(UAS:lnx1;UAS:RFP)* embryos compared with *Tg(UAS:RFP)* embryos, a phenotype similar to that of *lnx1* mRNA injection (data not shown). Moreover, quantification of *lnx1* mRNA levels demonstrated a strong expression of *lnx1* in *Tg(UAS:lnx1;UAS:RFP)* compared with *Tg(UAS:RFP)* control. However, no significant change in *lnx1* expression was observed in *rpl13a* and *ef1a*, used as reference genes (Figure Supp. 1B, C). These results replicated the defect of neural tube closure observed by *lnx1* mRNA injections and confirmed the phenotype upon ubiquitous early expression of *lnx1* (Figure 1).

Next, in order to test the effect of *lnx1* overexpression on NSC proliferation, we specifically overexpressed *lnx1* in NSCs by crossing *Tg(UAS:lnx1;UAS:RFP)* with *Tg(GFAP:Gal4)* adult zebrafish. Embryos were fixed at 36 hpf and proliferation was assayed by PH3 immunostaining. The results revealed similar GFAP<sup>+</sup>-NSC populations (pink color) in both conditions including *Tg(GFAP:Gal4;UAS:lnx1,UAS:RFP)* and *Tg(GFAP:Gal4;UAS:RFP)* (Figure 2E, in the left). However, *in vivo* overexpression of *lnx1* in NSCs in the *Tg(GFAP:Gal4;UAS:lnx1,UAS:RFP)* line revealed a large increase of PH3<sup>+</sup>-NSCs compared to the *Tg(UAS:RFP)* control line (Figure 2E, in the middle). This result indicates that early expression of *lnx1* in NSCs promotes their proliferation. Taken together, these results provide evidence that glycine/*lnx1* signaling modulates NSC proliferation through regulation of Notch activity (Figure 2F).

## 5. Discussion

During neuronal development, several molecular changes take place in NSCs when glycine signaling is disrupted (Samarut et al., 2016). We demonstrated by different approaches that disruption of glycine signaling induced an overexpression of *lnx1* in NSCs (Figure 1). While regulation of *Lnx2* transcription has been related to Gli3 and RunX2 (Pregizer et al., 2007, Wang et al., 2014), no transcription factors or pathways have been related to *lnx1* expression, leaving it as somewhat of an orphaned gene. However, increased *lnx1* expression reduces expression of the glycine transporter 2 (GlyT2) and impairs glycine transport in cortical neurons (Núñez E, 2017). We showed that disruption of glycine signaling by knockdown of glycine receptors induced an overexpression of *lnx1* in NSCs. Furthermore, we demonstrated that GFAP<sup>+</sup>-NSCs up-regulated *lnx1* upon disruption of glycine signaling (Figure 1). Thus, glycine signaling suppresses *lnx1*, which appears to increase GlyT2, possibly as a homeostatic mechanism to regulate glycine levels. On the other hand, a few studies have highlighted the potential role of the Lnx protein family during developmental stages. Investigation of the Shh signaling component “Gli3” revealed that in knockout mice (Gli3<sup>-/-</sup>) there is an increased expression of *Lnx2* and a dramatic decrease of Numb protein level in NSCs. As well, these Gli3<sup>-/-</sup> mice exhibit hydrocephaly and reduced cortical thickness (Wang et al., 2011, Wang et al., 2014). While *Lnx2* signaling during neurogenesis is well explored, the role of *Lnx1* in NSC development remained unknown. We demonstrated that transient expression of *lnx1* at an early stage of development caused a severe defect of neural tube closure in the head region, probably caused by the early loss of Numb proteins during embryogenesis. In support of our results, Numb<sup>-/-</sup> null mice exhibit a severe defect in cranial neural tube closure and die around embryonic day 11.5 (E11.5) (Zhong et al., 2000). These neural tube defects could be caused by disruption of neuronal development by affecting NSC proliferation.

We demonstrated that disruption of glycine signaling modulated Notch activity by increasing *her 4.1* expression. While it did not affect *numb* transcription, it reduced the Numb protein level as a consequence of *lnx1* overexpression (Figure 2). We reported in zebrafish that disruption of glycine signaling increased NSC proliferation (Cote and Drapeau, 2012, McDearmid et al., 2006). Herein, by using a novel transgenic

Tg(UAS:lnx1;UAS;RFP), we showed that overexpression of *lnx1* in NSCs they promotes their proliferation (Figure 2). These results provide compelling evidence that glycine signaling controls degradation of Numb *via* regulation of *lnx1* expression and modulates Notch activity and proliferation of NSCs. Over all, in this work we suggest that glycine/*lnx1* signaling controls NSC proliferation and differentiation by modulating the Notch pathway.

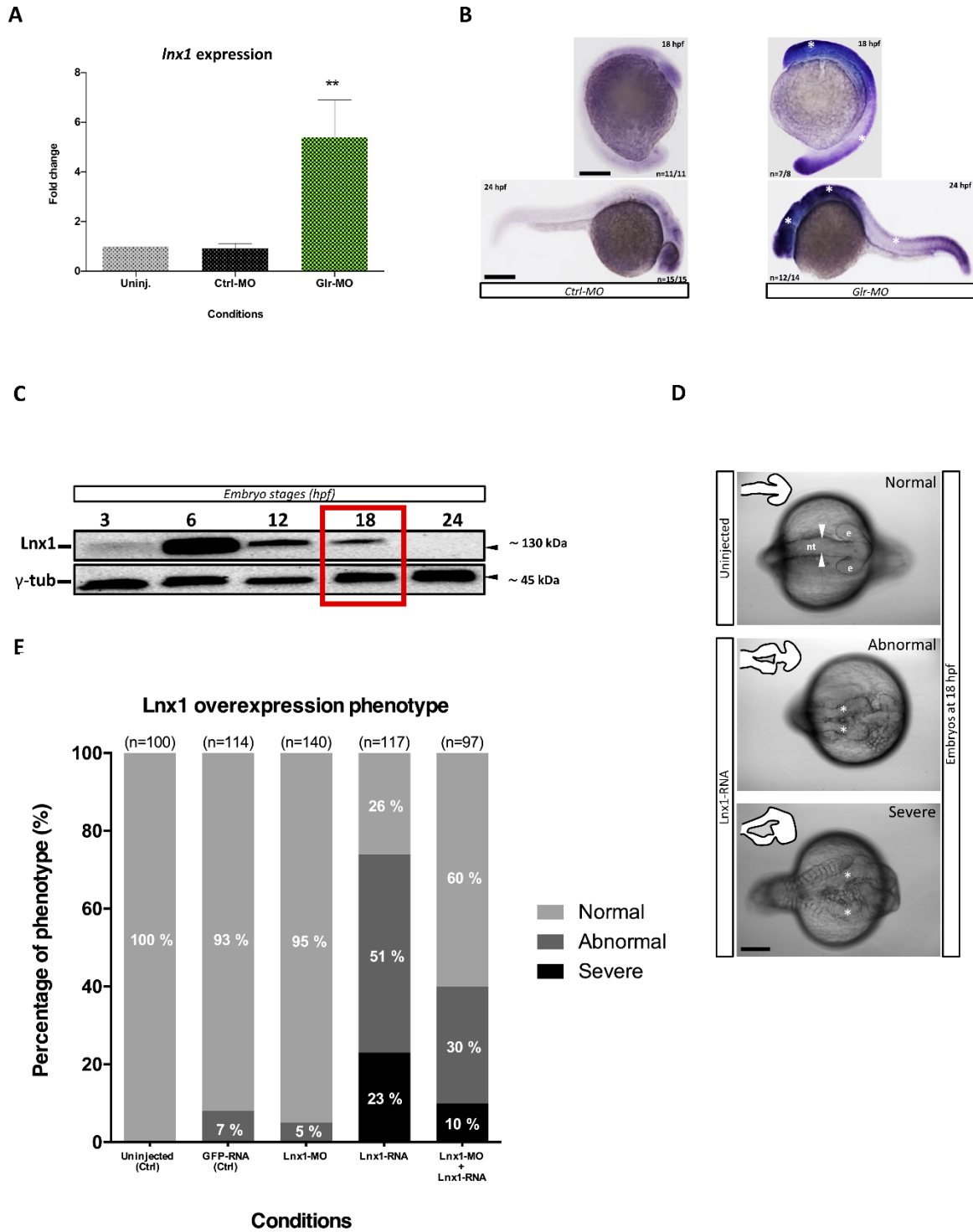
## **6. Author contributions**

A.B. conceived and performed most of experiments, generated the transgenic line with assistance from M.L., wrote the manuscript; M.L. provided expertise and feedback; A.B. and P.D. reviewed and edited the manuscript; P.D. supervision and funding acquisition.

## **7. Acknowledgments**

We thank Dr. Karl Fernandes and Lamia Sid-otmane for their critical reading and valuable comments on the manuscript. we also thank Marina Drits for her assistance with fish maintenance. This project was supported by funding from the Canadian Institutes of Health Research (grant no: MOP-130448; to P.D.)

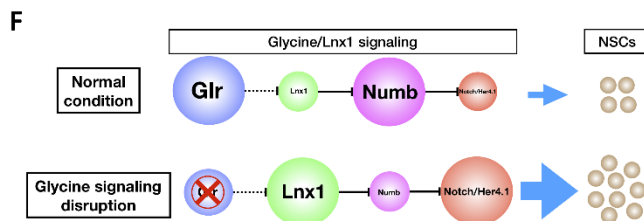
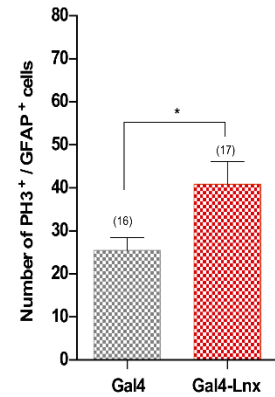
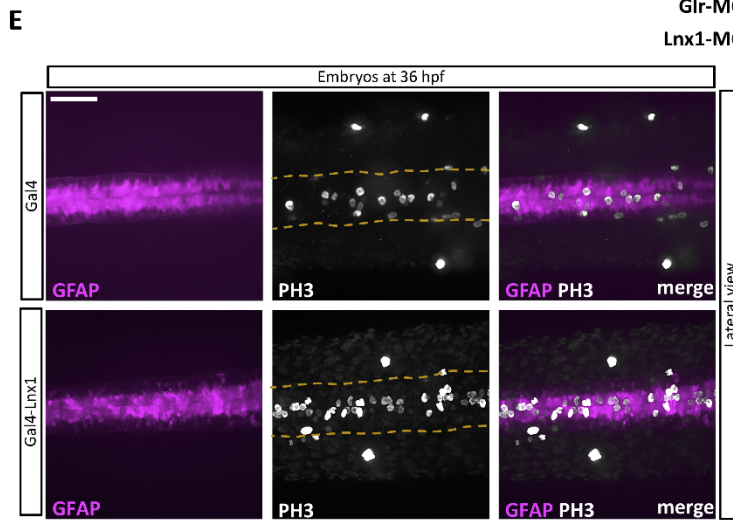
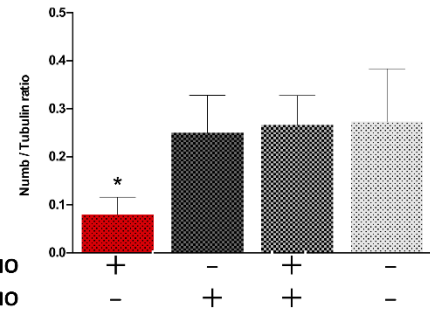
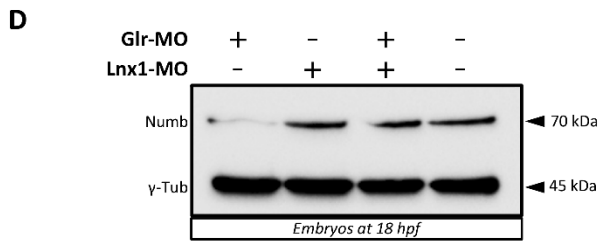
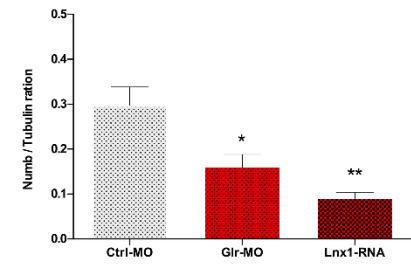
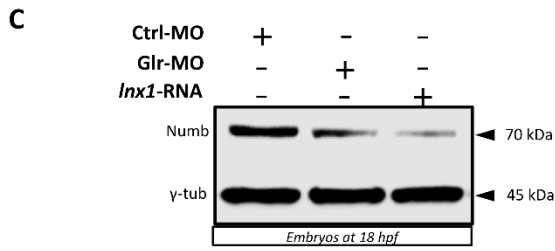
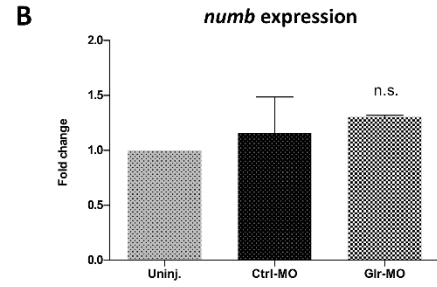
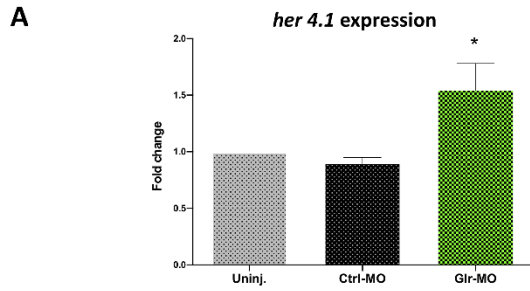
## 8. Figures and legends



**Figure 1. Glycine signaling regulates *lnx1* expression during neural tube development.**

(A) Quantification of *lnx1* expression into sorted GFAP<sup>+</sup>-NSC by RT-qPCR revealed a significant up-regulation of *lnx1* expression upon glycine signaling disruption compared with uninjected and Ctrl-MO conditions. One-way ANOVA statistical analysis was performed (n=3, \*\*p-value < 0.01). (B) Whole-mount *in situ* hybridization at 18 and 24 hpf revealed that disruption of glycine signaling by Glr-MO induces an overexpression of *lnx1* into CNS (right) compared with control condition (left). (Scale bar, 200  $\mu$ m.). (C) Time course of transient Lnx1 overexpression revealed by Western blot; embryos were injected with *lnx1-6myc* RNA then *in vivo* expression of Lnx1 protein was detected by anti-myc antibodies and followed during five-time point including, 3, 6, 12, 18 and 24 hpf, and anti- $\gamma$ -tub antibody was used as loading protein control. Red box indicate the stage chosen to assess the phenotype (D) Neural tube closes defects upon *lnx1* overexpression; embryos were injected with *lnx1-6myc* RNA, then neural tube was imaged at 18 hpf. Phenotype of neural tube defect closure caused by *lnx1* overexpression was divided into three classes: Normal neural tube (arrowheads), abnormal and severe defects (asterisks) from top to down respectively. Structure of neural tube was delineated in the corner of each image. (e, eye; nt, neural tube. Scale bar, 250  $\mu$ m.). (E) Quantification of *lnx1* overexpression phenotype in each condition including uninjected, GFP-mRNA, Lnx1-MO, Lnx1-RNA or Lnx1-MO and Lnx1-RNA embryos.

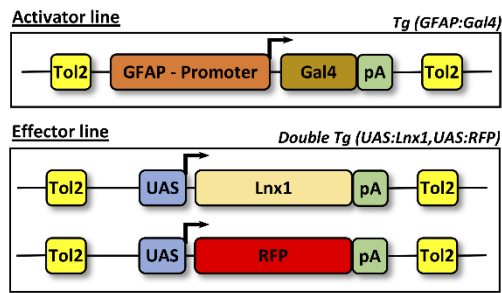




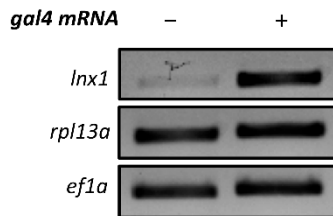
**Figure 2. Glycine signaling modulates notch activity via *lnx1* expression and promotes NSCs proliferation.**

Quantification of *her4.1* mRNA (A) and *numb* mRNA (B) level into sorted GFAP<sup>+</sup>-NSC by RT-qPCR revealed a significant increase of *her4.1* expression upon disruption of glycine signaling by Glr-MO compared with uninjected and Ctrl-MO conditions. However, no significant changing of *numb* expression was observed. One-way ANOVA statistical analysis was performed (n=3, \**p-value* < 0.05, not significant (n.s.)). (C) Expression of Numb protein was revealed by western bolt at 18 hpf showed a significant degradation of *numb* protein upon disruption of glycine signaling by Glr-MO and overexpression of *lnx1* by *lnx1* mRNA injection compared with Ctrl-MO injections which used as control condition. However, Co-injection of Glr-MO and *lnx1*-MO (D) rescued Numb protein degradation. One-way ANOVA statistical analysis was performed (n=3, \**p-value* < 0.05, \*\**p-value* < 0.01). (E) Proliferation of GFAP<sup>+</sup>-NSCs (pink) in spinal cord by PH3 immunostaining (white) into *tg(GFAP:Gal4, UAS:RED)* (Top panel), and *tg(GFAP:Gal4,UAS,lnx1,UAS:RED)* (bottom panel) revealed a significant increase of GFAP<sup>+</sup>-NSCs proliferation in *lnx1* overexpression embryos (right panel). One-way ANOVA statistical analysis was performed (n= 17, \*\**p-value* < 0.0001, scale bar, 250  $\mu$ m.). (F) The schematic model of regulation of Notch activity by glycine/*lnx1* signaling into zebrafish NSCs during early development.

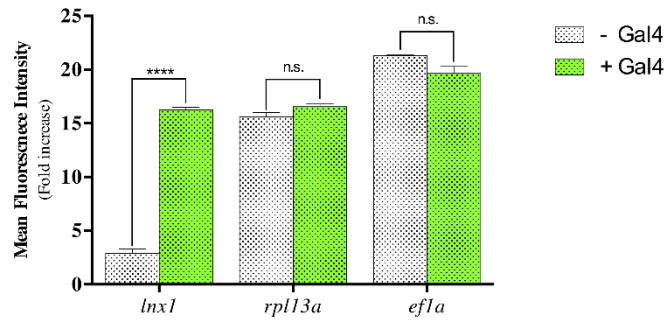
**A**



**B**



**C**



**Figure S1. Generation and validation of a novel UAS:lnx1 transgenic line.**

(A) Schematic representation of the strategy to generate and activate *lnx1* transcription into GFAP<sup>+</sup>-NSCs. (B) Transcriptional activation of *lnx1* into novel *tg(UAS:lnx1, UAS:RFP)* by *gal4* mRNA injection was visualised in the agarose gel, and showed a weak expression of *lnx1* without Gal4-activator compared with injecting *gal4* mRNA condition. In contrast, reference genes including *ef1a* and *rpl13a* showed no changing of expression in both conditions. (C) Quantification of transcriptional activation of *lnx1* by semi-RT-qPCR revealed a significant overexpression of *lnx1* in *tg(UAS:lnx1, UAS:RFP)* upon activation by *Gal4* mRNA injection, compared with uninjected embryos. In contrast, no changing in reference gene expression including *ef1a* and *rpl13a* were noted. One-way ANOVA statistical analysis was performed (n=3, \*\*\*\* p-value < 0.0001).

## 9. Supplementary material and methods

### 9.1. Transgenic line

To generate the UAS-*lnx1* transgenic line *Tg(UAS:lnx1;UAS:RFP)*, first we cloned full length *lnx1* into *pME* donor plasmid by using *XhoI* and *XbaI* restriction sites. Then, we used Gateway Cloning<sup>®</sup> multisite technology to recombine four plasmids. The *pME-lnx1* middle donor vector was aligned with the 5' entry *p5E-UAS* and 3' entry *p3E-polyA*, then inserted into *pDestTol2CG2* destination vector. The *pTol2\_UAS-lnx1* recombined construct was confirmed by sequencing. Second, *pTol2\_UAS-lnx1* construct (20pg) was injected with transposase *Tol2* mRNA (30 pg) into the *Tg(UAS:RFP)* embryos at the one-cell stage. Finally, screening of the F0 generation was performed by outcrosses and selected embryos with green hearts which should contain transmission insertion was raised and the insertion of *lnx1* was confirmed by PCR

### 9.2. FACS and RT-qPCR.

*Tg(GFAP:GFP)* embryos were injected at the one-cell stage with Glr-MO or Ctrl-MO. At 20 hpf embryos from each condition were dissociated and GFAP-NSCs were sorted by FACS and total RNA for each condition was extracted and *lnx1* expression was quantified by RT-qPCR. To generate statistical data, two independent experiments were performed, and PCR quantification experience was repeated three times for each condition. Two reference genes (*polr2d* and *ef1a*) was selected for PCR quantification. Sequences of primers used for RTqPCR were described in (Supp. Table). To semi-quantitative PCR, *tg(UAS:lnx1,UAS:RFP)* embryos were injected by gal4 mRNA. At 20 hpf embryos were dissociated and total RNA was extracted. To make cDNA, 1 µg of RNA was reverse transcribed. Then, *lnx1* expression was evaluated by semi-quantitative PCR as previously described. Sequences of primers used for semi RT-qPCR were described in (Supp. Table).

### 9.3. Whole-mount in situ hybridization and immunostaining.

Embryos were washed twice with phosphate-buffered saline 1X (PBS 1X) for 5 min each at room temperature and fixed overnight in cold 4% PFA. Embryos were then dehydrated in a gradient of methanol/PBS (25%, 50%, 75% and 100%) and stored in 100% ethanol at -20 °C. The embryos were then hydrated by inverted gradients and loaded into

sample holders and mounted into an *in situ* hybridization device (Flogentec). Embryos were subjected for 22 hours to a continuous stream (1.7 ml/min) of successive reagents following the *in situ* hybridization protocol as previously described (Bekri et al., 2014). Finally, enzymatic detection was performed in PM purple reagent (Roche) under constant observation. To make immunostaining, *tg(GFAPGal4;UAS:lnx1;UAS:RFP)* embryos at 36 hpf were washed twice by PBS 1X for 5 min each at room temperature and fixed overnight at +4°C in 4% PFA. Then, cell proliferation was assessed by immunostaining using primary antibody Anti-Phospho-Histone H3 and secondary antibody anti-rabbit conjugated with Alexa 488.

#### **9.4. Western blotting.**

Embryos were injected with *lnx1-6myc* or *gal4* mRNA or *GFP* mRNA (as control), then total protein was extracted at desired stages. Western blotting was performed by using total protein extraction from two embryos in each condition, which was resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel. Then, a western blot protocol was used as described previously (Swaminathan et al., 2018). To generate statistical data, three independent experiments were performed in each condition. Primary antibodies and dilution are as following: mouse, anti-myc, mouse, anti-NUMB and rabbit, anti- $\gamma$ -Tub. Detection was performed using secondary goat anti-mouse and goat anti-rabbit conjugated with horse-radish peroxidase antibodies. Proteins were revealed by ECL Chemiluminescent reaction and imaged using ChemiDoc (Biorad). To quantify proteins, densitometry bands of three independent western blot images were analyzed by using Image Lab. Software (Biorad). The densitometry on protein bands for each protein was normalized to the appropriate loading control.

#### **9.5. Probes and mRNA synthesis.**

To make probes or mRNA, total RNA was extracted from 24 hpf of zebrafish embryos. Then, total RNA was reverse transcribed to cDNA, which is used to amplify *lnx1* gene by PCR. To prepare *lnx1* probes a specific primer was designed to target around 1000 bp of *lnx1* coding sequence, then probes was prepared according to previous descriptions (Thisse and Thisse, 2008). Sequences of primers used to make probe were described in (Supp. Table). Then, *lnx1* full length was amplified by PCR and cloned in-frame of 6 x myc tag

into the *pCS2-MT* plasmid. To make *lnx1-6myc* or *Gal4 mRNA*, the *pCS2-lnx1-MT* or *pCS2-Gal4* were linearized by *NotI*. Then, 1 $\mu$ g of each linearized plasmid were used to synthesize *lnx1-6myc* or *Gal4 mRNA*, respectively. *Sp6* transcription mMACHINE system (Ambion) was used to synthesize capped mRNA of each genes including, *lnx1-6myc* and *Gal4* mRNAs.

Table 1. KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Anti-rabbit conjugated with Alexa488	ThermoFisher	Cat#R37116
Anti-Rabbit Conjugated to Horseradish Peroxidase	Jackson ImmunoResearch	Cat#111-035-144
Gamma-Tubulin	Sigma	Cat#M4439
Myc-tag	ThermoFisher	Cat#13-2500
Numb	Santa cruz	Cat#sc-136554
Phospho histone H3	Millipore	Cat#06-570
<b>Bacterial and Virus Strains</b>		
DH alpha competent cells	Invitrogen	Cat#18265-017
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
Anti-sens <i>lnx1</i> -RNA probes Conjugated to DIG	Synthesized	N/A
RNA extracted from zebrafish at 20 hpf	This study	N/A
Protein extracted from zebrafish at 20 hpf	This study	N/A
full length <i>lnx1-myc</i> RNA	Synthesized	N/A
full length <i>gal4</i> RNA	Synthesized	N/A
Morpholinos to knockdown <i>Glr</i> and <i>lnx1</i> : sequence in methods	Gene Tools	<a href="http://www.gene-tools.com">http://www.gene-tools.com</a>
<b>Critical Commercial Assays</b>		
mMESSAGE mMACHINE SP6 kit	Ambion	Cat#AM1340
Superscript VILO cDNA synthesis kti	Invitrogen	Cat#11754050
LR Clonase™ II Plus enzyme	ThermoFisher	Cat#12538120
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoFisher	Cat#K1621
<b>Experimental Models: Organisms/Strains</b>		
Tubingen long wild type zebrafish (TL)	ZIRC	ZIRC_ID: ZL86
<i>Tg(UAS:RFP)</i> zebrafish line	ZFIN	ID: ZDB-TGCONSTRCT-151214-11
<i>Tg(UAS:LNX1;UAS:RFP)</i> zebrafish line	This study	N/A
<i>Tg(GFAP:GAL4)</i> zebrafish line	ZFIN	ID: ZDB-TGCONSTRCT-170119-1
<b>Oligonucleotides</b>		
RT-qPCR primers for <i>lnx1</i> , <i>her4.1</i> and <i>numb</i> : sequence in methods <i>ef1a</i> -F: 5'-CCTTCGTCCCAATTTCCAGG-3' <i>ef1a</i> -R: 5'-GGGTGGTTCAGGATGATGAC-3' <i>rpl13a</i> -F: 5'-GCGGACCGATTCAATAAGG-3' <i>rpl13a</i> -R: 5'-CTCCAGTGTGGCGGTGAT-3'. <i>lnx1</i> -F2: 5'-TGGAGGATAACAGCCAATCC-3' <i>lnx1</i> -R2: 5'-GTCCTGTGCGAAGTTGCGATT-3' <i>her4.1</i>	sigma	N/A
Primers for cloning <i>lnx1</i> : sequence in methods <i>lnx1</i> -F3: 5'-GCATCATCTAATCCCTGATGG-3' <i>lnx1</i> -R3: 5'-CCTCCAGCAGGTGGAAGAT-3'	sigma	N/A
Primers to make <i>lnx1</i> probes: sequence in methods ( <i>lnx1</i> -F1): 5'-GGTTGGGATTTACCCGTCTAT-3' ( <i>T7-Lnx1</i> -R): 5'-TAATACGACTCACTATAGGGTCCATGGTGCCTCCTGTAG-3	sigma	N/A
<i>lnx1</i> -MO: 5'-TCAGTTGCGTTTTGAGCCATCCAC-3	Gene Tools	<a href="http://www.gene-tools.com">http://www.gene-tools.com</a>
<b>Recombinant DNA</b>		
pCS2	addgen	<a href="http://www.addgene.org">www.addgene.org</a>
pCS2-MT	addgen	<a href="http://www.addgene.org">www.addgene.org</a>
pCS2- <i>lnx1</i> -MT	This study	N/A
pCS2- <i>lnx1</i>	This study	N/A
Tol2Kit	Tol2kit	<a href="http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Main_Page">http://tol2kit.genetics.utah.edu/index.php/Main_Page</a>
<b>Software and Algorithms</b>		
Volocity	Improvisation-Perkin Elmer	<a href="http://www.perkinelmer.com">http://www.perkinelmer.com</a>
Imagelab	Biorad	<a href="http://www.bio-rad.com">http://www.bio-rad.com</a>
Flogentec	Flogentec	<a href="http://www.flogentec.com/">http://www.flogentec.com/</a>
LightCycler 480	Roche	<a href="https://lifescience.roche.com">https://lifescience.roche.com</a>



# CHAPITRE VI

Discussion et perspectives

# 1. Résultats et contribution générale

## 1.1. Résumé des résultats

Dans la première partie de ce travail, nous avons développé une technique pour analyser *in vivo* des mécanismes moléculaires à l'échelle cellulaire. En effet, nous avons pu déterminer les voies de signalisation liées à l'activité glycinergique dans les CSNs. Cette approche est basée sur la combinaison de trois éléments essentiels :

- i. Une lignée transgénique du modèle poisson-zèbre qui exprime le GFP sous le contrôle du promoteur GFAP, un marqueur spécifique des CSNs.
- ii. L'isolation et le tri des CSN-GFP positives par cytométrie de flux (FACS).
- iii. L'analyse de l'expression des gènes par séquençage de l'ARN total des CSN-GFP.

Grâce à cette approche, nous avons révélé pour la première fois les mécanismes moléculaires dépendants de l'activité glycinergique durant la neurogenèse. En effet, nous avons montré que l'expression de plusieurs gènes (>2000) dépend de la signalisation de la glycine dans les CSNs durant le développement embryonnaire. De plus, nous avons démontré que ces gènes appartiennent principalement à cinq voies de signalisation incluant la voie de signalisation du calcium, de Wnt, de Shh, de TGF-bêta et de P53. Ces dernières sont bien connues pour être impliquées dans plusieurs mécanismes cellulaires durant le développement embryonnaire.

Il est intéressant de noter que la modulation du calcium par l'activité glycinergique dans les CSNs a été révélée dans une étude précédente dans notre laboratoire (Brustein et al., 2013). Ceci démontre une cohérence et une confirmation de ce mécanisme de régulation entre le calcium et l'activité glycinergique. La suite de mon travail cherchait en premier lieu à confirmer et explorer plus en profondeur certains de ces mécanismes moléculaires dépendants de la signalisation de la glycine. En deuxième lieu, il était question de définir et caractériser les phénotypes cellulaires liés à ces mécanismes moléculaires.

La deuxième partie de ma thèse explore donc une possible régulation de la survie des CSNs par l'activité glycinergique. En effet, les résultats obtenus dans la première partie soulignent une activation de la voie apoptotique *via* la surexpression de p53 lors de la

perturbation de l'activité glycinergique ( Chapitre IV). Suite à cela, j'ai analysé et confirmé par d'autres approches que la perturbation de l'activité glycinergique induit une surexpression de p53 spécifiquement dans les CSNs. De plus, j'ai démontré par différentes approches techniques que la perturbation de l'activité glycinergique provoque une mort cellulaire transitoire durant le développement du SNC. Ceci se fait par l'activation, dans les CSNs, de la caspase 3, un marqueur de la mort cellulaire par voie apoptotique.

J'ai également démontré par imagerie *in vivo* et à l'échelle cellulaire que la modulation de l'activité glycinergique perturbe le cycle cellulaire des CSNs et cause leur mort par voie apoptotique. Enfin, en utilisant des marqueurs spécifiques des sous-populations des CSNs, j'ai démontré que, contrairement à la sous-population des CSN-GFAP+, la modulation de l'activité glycinergique provoque une perte des CSN-nestin+, suggérant un effet cellule dépendant de la signalisation de la glycine sur la survie des CSNs durant le développement embryonnaire.

Dans la dernière partie de mon travail de thèse, j'ai exploré les résultats transcriptomiques générés par la première étude, soit la forte surexpression du gène *lnx1* lors de la perturbation de la signalisation de la glycine. LNX1 est une ubiquitine ligase E3 connue davantage pour son rôle de suppresseur de tumeurs potentielles dans divers cancers, dont le gliome (Chen et al., 2005, Hu et al., 2015). Cependant, le rôle de LNX1 dans les CSNs était totalement inconnu. Dans cette partie, j'ai mis en évidence pour la première fois le rôle de l'activité glycinergique dans la régulation de la signalisation de Notch *via* la modulation de l'expression de *lnx1* durant la neurogenèse. En effet, en utilisant des approches génétiques, j'ai montré que la suppression de l'activité glycinergique favorise l'expression de *lnx1*. Ce dernier provoque l'activation de la signalisation de Notch *via* l'inhibition de NUMB, inhibiteur de l'activité de Notch. Ces résultats sont validés avec l'observation d'une activation des gènes cibles de la famille *hes/hey* lors de la perturbation de l'activité glycinergique dans les CSNs.

Lors d'études ultérieures, nous avons démontré dans le laboratoire que la perturbation de l'activité glycinergique favorise la prolifération des CSNs. Nous savons aussi maintenant avec mes résultats que la perturbation de l'activité glycinergique induit une

surexpression de *lnx1*. Pour terminer, j'ai également démontré que la surexpression de *lnx1* dans les CSNs favorise leur prolifération. Ceci démontre une cohérence concernant le rôle de la signalisation de la glycine / *lnx1* dans la prolifération des CSNs.

Dans l'ensemble, ces résultats combinés apportent un éclaircissement concernant le rôle que l'activité glycinergique peut jouer dans les mécanismes moléculaires et cellulaires des CSNs durant la neurogenèse.

## **1.2. Pertinence et contribution générale**

Dans ce projet de thèse, j'ai utilisé le poisson-zèbre comme organisme modèle pour comprendre le rôle de l'activité glycinergique dans le développement du SNC. Le travail présenté dans cette thèse est porté sur deux objectifs :

- 1- Déterminer le mécanisme moléculaire et cellulaire de la glycine durant la neurogenèse.
- 2- Déterminer le rôle de la glycine dans le développement du SNC.

Les résultats générés dans ces études ont révélé plusieurs découvertes pertinentes dans la compréhension du rôle de la glycine dans le développement du SNC embryonnaire. Ces résultats ont été publiés dans trois différentes publications. Dans cette section nous allons discuter de la pertinence de ces résultats dans le contexte de la compréhension du rôle de la glycine dans le développement du CSN embryonnaire, et présenter les perspectives et l'orientation future de ce projet de recherche.

## 2. Glycine, mécanisme moléculaire et neurogenèse

Cette section discutera de la pertinence de la voie de signalisation P53 et LNX1/Notch, dans la compréhension du rôle de l'activité glycinergique dans la neurogenèse.

### 2.1. Principales voies de signalisation impliquées dans la neurogène

Durant le développement du SNC, la plupart des neurones se différencient à partir des CSNs. Malgré cette certitude, la compréhension actuelle de l'auto-renouveau de la population de CSNs et des facteurs qui régulent leur maintien et leur différenciation en neurones reste limitée. Les signaux intracellulaires représentent l'un des facteurs majeurs à la fois dans le développement et le maintien de la population de CSNs. Chez les vertébrés, plusieurs cascades de signalisation ont été identifiées comme étant requises au processus de développement du SNC. Nos résultats démontrent que l'activité glycinergique régule plusieurs de ces voies importantes dans les CSNs dont Notch, Shh, Wnt et p53. Ceci prouve l'implication de l'activité glycinergique dans le développement du SNC.

Durant le processus de neurogenèse, ces signalisations jouent un rôle spatiotemporel dans le développement du SNC. Alors que la signalisation Wnt est impliquée par exemple dans la mise en place des axes embryonnaires (Gomez et al., 2019), la signalisation Shh est essentielle pour la formation dorso-ventrale du SNC des vertébrés (Willaredt et al., 2013), tandis que la voie Fgf régule la formation antéro-postérieure du cerveau durant la neurogenèse (Rash et al., 2011). Il serait donc possible que l'activité glycinergique, à travers sa contribution dans ces voies de signalisation, joue un rôle central et communicatif entre ces voies dans le développement du SNC.

Plusieurs études ont montré que certaines des voies de signalisation mentionnée plus haut peuvent communiquer entre elles et interagir de manière significative pour réguler la prolifération et la différenciation des CSNs. Il a en effet été établi que durant le développement du néocortex, l'activation de Shh favorise la prolifération des CRGs à travers l'activation de la voie de Notch (Dave et al., 2011). Une telle interaction a été démontrée également entre la voie Fgf et Notch. Ainsi, l'activation de Fgf favorise la division asymétrique *via* l'activation de Notch (Rash et al., 2011). Ces interactions entre les voies de signalisation jouent un rôle clé dans la prolifération et la différenciation des

CSNs. Celles-ci varient toutefois selon les stades de développement, les régions et les types cellulaires, soulignant la complexité du développement neuronal chez les vertébrés. Les nouvelles révélations dans cette thèse concernant l'implication de l'activité glycinergique peuvent aider à mieux comprendre ce phénomène de régulation.

## **2.2. Régulation de l'activité de Notch et de *lnx1* par l'activité glycinergique**

Les LNXs (Ligand of NUMB Protein X) sont des ubiquitines ligases E3, connues pour leurs capacités à interagir avec la protéine NUMB pour favoriser sa dégradation. NUMB interagit quant à elle avec le récepteur Notch et inhibe ainsi son activité en modulant l'endocytose ou le trafic de Notch post-endocytose (Kandachar and Roegiers, 2012). Le rôle des protéines LNXs dans la modulation de la signalisation NUMB/Notch a été largement exploré dans plusieurs processus tels que la régulation du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses (Blom et al., 2008, Ma et al., 2017). Jusque-là, aucune étude ne faisait état d'un lien ou d'une implication de la signalisation de la glycine dans la régulation de l'expression de *lnx1* et/ou l'activité de Notch dans le développement des CSNs.

De nombreux travaux ont révélé la présence de l'ARNm de *lnx1* dans différents types de cellules. Il est pertinent de noter que plusieurs de ces études ont démontré une expression de *lnx1* relativement élevée dans diverses populations de cellules souches et progénitrices telles que les cellules précurseurs d'oligodendrocytes (Cahoy et al., 2008), les cellules souches limbiques de l'œil (Akinici et al., 2009) et les cellules musculaires quiescentes (Pallafacchina et al., 2010). En revanche, les facteurs qui régulent la transcription des gènes *lnx* demeurent énigmatiques. On retrouve deux études abordant la régulation de l'expression de *lnx2*. La première démontre que le facteur de transcription RUNX2 contrôle l'expression de *lnx2* durant la squelettogenèse (Pregizer et al., 2007). Dans la seconde étude réalisée sur des souris, la mutation du répresseur transcriptionnel GLI3R dans les CSNs est démontrée, provoquant une dégradation de NUMB à cause de la surexpression de *lnx2* dans la zone subventriculaire embryonnaire (Wang et al., 2014).

Dans nos travaux, nous apportons un nouvel élément sur la régulation de l'expression de *lnx1* par la signalisation de la glycine. L'activité glycinergique bloque la transcription de *lnx1* et une perturbation de cette activité dans les CSNs induit une surexpression de *lnx1*.

Récemment, une étude réalisée *in vitro* sur des neurones matures qui surexpriment *lnx1* a révélé l'existence d'une interaction entre LNX1 et GlyT2 (glycine transporter 2). En effet, en utilisant des techniques d'imagerie et d'interaction protéique, cette étude a montré que LNX1 interagit avec l'extrémité C-terminale de GlyT2 dans les neurones matures en ubiquitinant le groupe C-terminal de lysines et provoquant ainsi la dégradation de GlyT2. De plus, ils ont montré qu'une augmentation de l'expression de *lnx1* dans les neurones réduit l'expression de GlyT2 sur la surface membranaire (de la Rocha-Muñoz et al., 2019, Núñez E, 2017). Dans l'ensemble, ces deux publications combinées avec la publication présentée dans le chapitre V de cette thèse montre qu'une perte de fonction des GlyRs favorise la surexpression de *lnx1*, et ce dernier semble interagir avec GlyT2 pour réguler son fonctionnement en réduisant son expression. Ceci semble présenter un mécanisme d'homéostasie dont le but est de réguler les niveaux de glycine dans le SNC.

### **2.3.La signalisation de la glycine régule l'expression de p53**

La propriété cytoprotectrice de la glycine contre la mort cellulaire a été révélée il y a plus de 30 ans (Weinberg et al., 1987). Ce comportement protecteur de la glycine est largement observé dans de multiples tissus tels que les cellules rénales, vasculaires et inflammatoires. Cependant, dans le SNC et plus particulièrement les CSNs, la signalisation par la glycine est plus connue pour son potentiel à générer un signal électrique. Dans les neurones matures, la glycine est synthétisée, relarguée et recyclée en réponse à une stimulation électrique. À ce niveau, l'activité glycinergique permet d'inhiber ou de limiter la fréquence des potentiels d'action dans des neurones matures. Cependant, cette activité chez les neurones immatures (CSNs) change et joue un rôle excitateur (Ben-Ari, 2002).

Dans cette dernière décennie, plusieurs études ont exploré la présence de l'activité glycinergique dans les CSNs. Des analyses effectuées *in vitro* et *in vivo* sur des CSNs ont révélé par des approches génétiques la présence de récepteurs de la glycine fonctionnels dans une sous-population de CSNs qui expriment spécifiquement nestin, sans pour autant déterminer un mécanisme moléculaire impliquant ces deux éléments dans une voie apoptotique (Lin et al., 2017, Nguyen et al., 2002). Dans nos travaux, nous avons démontré que le blocage de la signalisation de la glycine favorise l'activation de la voie apoptotique p53/Cas3 dans les CSNs et provoque la perte des cellules exprimant le nestin durant le développement embryonnaire.

L'implication de nestin dans la mort cellulaire a été explorée dans de nombreuses études. Des travaux effectués *in vivo* sur la fonction du gène nestin chez le poisson-zèbre ont révélé que la perte de fonction de nestin cause une mort des CSNs *via* l'activation de p53 (Chen et al., 2010). De plus, il a été démontré dans une étude différente que, dans des carcinomes, la sous-régulation de nestin *via* des microRNA-940 (Mir-940) cause la mort cellulaire par l'activation de Cas3, un produit de la voie de signalisation de p53 (Ma et al., 2014). Dans ce contexte, la suppression de l'expression de nestin par la perturbation de la signalisation de la glycine peut être la cause de l'activation de la voie apoptotique p53/aCas3. Pour mieux comprendre ce mécanisme de régulation de p53 par l'activité glycinergique, une étude récente sur différentes cellules cancéreuses a révélé que *lnx1* interagit avec p53 et régule l'expression de celle-ci. Cet élément propose une nouvelle hypothèse sur l'implication de *lnx1* dans la régulation de la voie apoptotique p53 par l'activité glycinergique.



### 3. Glycine et développement des CSNs

Dans ce manuscrit, j'ai montré *in vivo* que la surexpression de *Inx1* dans les CSNs augmente leur prolifération durant le développement embryonnaire. Ce même phénomène de prolifération a déjà été observé lors de perturbations de l'activité glycinergique (Cote and Drapeau, 2012, McDearmid et al., 2006). Dans une autre étude, j'ai démontré que la signalisation de la glycine joue un rôle important dans la survie et le développement des CSNs. En effet, la perturbation de l'activité glycinergique affecte spécifiquement la survie des CSNs par activation de la voie apoptotique p53 durant la neurogenèse. J'ai également observé une perte sélective et transitoire de la sous-population des CSN-nestin+ suite à cette perturbation (Chapitre IV). Je discuterai ici de deux éléments, soit de l'implication potentielle de la signalisation de la glycine pour réguler la balance entre la prolifération et la différenciation des CSNs, et des molécules de signalisation possiblement impliquées dans ce phénomène.

#### 3.1. La voie de signalisation glycine/*Inx1* régule le développement des CSNs

Chez le poisson-zèbre, la perturbation de l'activité glycinergique cause une réduction de la population des interneurons et maintient la prolifération des CSNs durant le développement (Cote and Drapeau, 2012, McDearmid et al., 2006). Mes résultats de thèse montrent que la surexpression de *Inx1* dans les CSNs favorise la prolifération de ces dernières. Aussi, j'ai observé une augmentation de l'expression de *Inx1* lors de la perturbation de l'activité glycinergique. Mis ensemble, ces résultats démontrent que la régulation de la prolifération des CSNs par la signalisation de la glycine est médiée par l'expression de *Inx1*. La régulation de la prolifération des CSNs par la voie de signalisation glycine/*Inx1* représente un nouvel élément à explorer pour la compréhension de ceux-ci.

Plusieurs études ont exploré le grand potentiel des protéines LNXs à interagir avec d'autres protéines. La majorité de ces protéines sont exprimées spécifiquement dans les régions du développement du cortex. En effet, l'interaction de LNX2 avec Caspr4, une protéine transmembranaire présente dans la ZSV et exprimée dans les cellules progénitrices neurales, permet la régulation de leurs différenciations (Yin et al., 2015). Une autre étude distincte propose un rôle de LNX1/2 dans le contrôle de la balance entre la prolifération et la

différenciation des CSNs grâce à son interaction avec SHOOTIN1, une protéine localisée dans la région apicale des CRGs qui régule les divisions symétriques et asymétriques de ces dernières (Sapir et al., 2017).

L'interaction de LNX avec NUMB est la voie de signalisation la plus explorée à cause de son implication dans la régulation de l'activité de Notch et du devenir des CSNs durant la neurogenèse. NUMB est une protéine avec plusieurs fonctions qui joue un rôle primordial dans la régulation du cycle cellulaire et le devenir des CSNs durant la neurogenèse. En effet, la distribution égale de NUMB à l'intérieur des CSNs permet d'avoir une division symétrique en donnant deux CSNs filles identiques. Cependant, la distribution inégale de NUMB dans les CSNs promouvoit la division asymétrique, qui permet de donner une CSN fille et une cellule différenciée (Paridaen and Huttner, 2014). Mes résultats démontrent qu'une perturbation de l'activité glycinergique diminue l'expression de NUMB par l'intermédiaire d'une augmentation de l'expression de *lnx1*. Cette diminution pourrait perturber la balance entre les divisions symétriques et asymétriques des CSNs, ce qui expliquerait l'augmentation de la prolifération des CSNs observée lors de la perturbation de l'activité glycinergique. On a également observé une augmentation de l'expression de *her4*, un marqueur de l'activité de Notch, lors de cette perturbation de l'activité glycinergique. Ceci confirme la dégradation de NUMB, inhibiteur de Notch, par LNX1.

Le mécanisme de régulation de la balance entre la division symétrique et asymétrique des CSNs reste toujours un mystère dans la biologie du développement. Une piste intéressante – pour dire, celle qui me semble la plus fascinante à explorer – serait de tenter de disséquer l'implication de l'activité glycinergique dans la régulation de cette balance *via lnx1* durant la neurogenèse.

### **3.2. La signalisation de glycine favorise la survie des CSNs durant la neurogenèse**

Durant le développement embryonnaire, la mort cellulaire par voie apoptotique joue un rôle fondamental dans le développement des organismes pluricellulaires et régule plusieurs mécanismes cellulaires tels que la division, la différenciation et l'autorenouvellement de la cellule. En effet, dans un contexte physiologique, un changement génétique ou chimique qui perturbe ces mécanismes cellulaires déclenche un

processus de suicide cellulaire. Dans le système nerveux, la mort cellulaire est un mécanisme normal qui régule le nombre de neurones. Ceci se fait par voie apoptotique.

L'implication de p53 dans la régulation du cycle cellulaire est bien documentée. En effet, une quantité élevée de p53 peut arrêter le cycle cellulaire par le blocage de la transition entre la phase G1/S (el-Deiry et al., 1993) ou G2/M (Chan et al., 1999). J'ai montré au cours de ma thèse que la perturbation de l'activité glycinergique provoque une mort transitoire des CSNs *via* l'activation de la voie apoptotique p53/Cas3. Aussi, j'ai démontré par des techniques d'imagerie *in vivo* que cette perturbation bloque la MNI des CSNs. Aussi, j'ai démontré par des techniques d'imagerie *in vivo* que cette perturbation bloque la MNI des CSNs, et ainsi leur division. Ce phénomène peut ouvrir une nouvelle fenêtre sur une potentielle implication de l'activité glycinergique à réguler la MNI des CSNs.

J'ai également observé que la perturbation de la signalisation de glycine cause une perte de l'expression de Nestin, une protéine à filaments intermédiaires qui forme, avec les microtubules et microfilaments, le cytosquelette des CSNs. Ces filaments intermédiaires jouent aussi un rôle dans les mécanismes qui régulent le cycle cellulaire (Foisner, 1997). Une étude intéressante a révélé que la perte fonctionnelle de Nestin chez les embryons du poisson-zèbre provoque une mort des CSNs *via* la voie apoptotique p53 (Chen et al., 2010). L'ensemble de mes résultats sont consistants et complémentaires à ce qui est observé dans la littérature. Ils indiquent un potentiel mécanisme dépendant de l'activité glycinergique pour réguler la survie des CSNs et pouvant être lié à la stabilité de Nestin durant la division cellulaire.

Dans l'ensemble de ce projet de thèse, nous avons analysé le rôle de l'activité glycinergique dans les CSNs. Nous avons révélé plusieurs mécanismes moléculaire et cellulaire dépendant de l'activité glycinergique dans les CSNs. Ces révélations vont contribuer dans le futur à comprendre certains troubles neurodéveloppementaux lié à des perturbations de l'activité glycinergique et développer des cibles thérapeutiques.

## 4. Perspectives

Au cours de cette thèse, j'ai utilisé le poisson-zèbre comme modèle pour mettre en lumière l'activité glycinergique dans les CSNs. J'ai mis en évidence des mécanismes moléculaires et cellulaires dépendants de cette activité et jouant un rôle important dans la neurogenèse. Cependant, plusieurs points restent à approfondir pour mieux comprendre le rôle de l'activité glycinergique au cours de la neurogenèse.

*Outils et modèle animal* – Dans les trois publications, j'ai exploré le rôle de l'activité glycinergique par une stratégie basée sur la perte de fonction du GlyR en utilisant des morpholinos, ceci dans le but de perturber la signalisation de la glycine dans les CSNs. Parmi les limites de cette stratégie, on y trouve l'effet transitoire des morpholinos qui ne permet pas une étude à long terme du rôle de l'activité glycinergique durant la neurogenèse.

De plus, la controverse entourant l'utilisation des morpholinos pour induire un «knockdown» génère des opinions scientifiques divergentes concernant la spécificité de cette méthode. En effet, on trouve plusieurs études qui démontrent un effet spécifique des morpholinos générant des phénotypes tels que la mort neuronale via l'activation de la voie de signalisation p53. Ces études ont été validées par des méthodes de co-injection de morpholinos avec des ARNs ou ADNs du gène cible pour rétablir le phénotype (Campbell et al., 2006). D'un autre côté, certaines études évoquent un effet «OFF-target» des morpholinos induisant un effet non-spécifique de la mort cellulaire via l'activation de la voie de signalisation p53 (Robu et al., 2007). Pour remédier à cet inconvénient, deux autres stratégies peuvent être utilisées pour perturber l'activité glycinergique.

La première méthode consiste à utiliser la technologie CRISPR/Cas9 pour générer des lignées mutantes stables et introduire des mutations spécifiques au niveau des sous-unités du récepteur de la glycine. Ce travail a été amorcé dans notre laboratoire dans une autre étude. Toutefois, la complexité du récepteur de la glycine rend cette tâche plus difficile et longue. En effet, tel que décrit plus haut, il existe six sous-unités exprimées par six différents gènes, et chacun de ces gènes peut former, individuellement ou en complexe avec d'autres sous-unités, le récepteur de la glycine. Donc, la mutation d'une seule sous-unité ne suffit pas à reproduire le phénotype recherché et observé avec l'utilisation des morpholinos. Cette difficulté peut être

expliquée par un phénomène de compensation de la sous-unité mutée par les autres sous-unités (El-Brolosy et al., 2019, Rossi et al., 2015).

Pour remédier à ce problème, une bonne stratégie consisterait à utiliser la technologie du CRISPR/Cas9 pour générer au moins quatre mutations simultanées dans un seul poisson-zèbre. Ceci peut toutefois prendre du temps lors du criblage de la lignée afin de sélectionner la lignée comportant simultanément les 4 mutations. Lorsqu’accomplie, la génération de cette lignée peut être un outil considérable pour l’étude du rôle à court et long terme de l’activité glycinergique dans les CSNs et de la pathophysiologie des troubles issus de ces mutations.

La deuxième stratégie consiste à générer une lignée transgénique stable qui exprime des micro-ARNs (miARNs) dirigés spécifiquement contre les transcrits des sous-unités du GlyR. La force de cette stratégie se définit dans la possibilité de provoquer une perturbation de l’activité glycinergique dans des populations de cellules ciblées grâce à des promoteurs spécifiques et au système GAL4/UAS décrit plus haut (chapitre V). J’ai entamé ce travail au cours de ma thèse, avec une première génération de la lignée transgénique générée. Cette lignée est actuellement en élevage pour des projets futurs dans le laboratoire et sera d’une grande utilité dans l’approfondissement des connaissances issues de mes travaux de recherche.

Dans l’ensemble, ces deux stratégies peuvent être des outils fortement recommandés pour contourner certains obstacles rencontrés lors de mes travaux de thèse. Ceci peut ouvrir plusieurs portes pour des études de perturbation à long terme de l’activité glycinergique (permanente) et pour des études de comportement. Il sera ainsi possible d’analyser la pathophysiologie liée à la mutation du GlyR et de déterminer le mécanisme moléculaire relié à cela.

*Mécanisme moléculaire* – durant mes travaux de thèse, j’ai dévoilé plusieurs voies de signalisation dépendantes de l’activité glycinergique dans les CSNs (Chapitre III). Mon projet s’est focalisé sur la compréhension de deux de ces voies de signalisation, soit la voie de Notch et de p53. Il serait intéressant d’approfondir la compréhension du rôle de l’activité glycinergique en explorant les autres voies révélées dans la première étude telles que la signalisation de Wnt et Shh (Chapitre III). Aussi, durant mes travaux de thèse, j’ai identifié un nouveau gène candidat (*lnx1*) qui pourrait jouer un rôle clé et central dans l’activité

glycinergique durant le développement du SNC (Chapitre III et V). Explorer davantage le lien entre ces deux éléments pourrait éclaircir la compréhension du mécanisme moléculaire de l'activité glycinergique. Récemment, des études ont identifié une régulation entre *Lnx1* et GlyT2. Ce dernier contrôle le niveau de la glycine à l'intérieur des cellules du SNC (Zafra and Gimenez, 2008). Examiner cette régulation dans le contexte de mes résultats de thèse, ajouteraient des réponses pertinentes dans la compréhension de la signalisation glycine/*lnx1*, qui semble jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie de la glycine à l'intérieur des cellules du SNC.

Dans un autre volet de ma thèse, j'ai démontré que la signalisation de la glycine favorise la survie des CSNs *via* la régulation de la signalisation de P53 (chapitre IV). Il est intéressant de noter qu'une étude récente sur des cellules cancéreuses a démontré la contribution de *lnx1* à la croissance tumorale en régulant la stabilité de p53 (Park et al., 2019). Évaluer cette interaction avec l'hypothèse que *lnx1* pourrait être un régulateur intermédiaire entre la signalisation de la glycine et p53 sera un grand développement de mes résultats de thèse. *Lnx1* joue un rôle central dans les mécanismes moléculaires dépendants de l'activité glycinergique, et la compréhension de ce rôle peut conduire à l'identification d'une cible thérapeutique dans la prévention de pathologies liées au dysfonctionnement de l'activité glycinergique.

*Mécanisme cellulaire* – Dans l'idée que *lnx1* pourrait jouer un rôle central dans les mécanismes moléculaires dépendants de l'activité glycinergique, plusieurs mécanismes cellulaires liés à l'activité de *lnx1* peuvent être explorés. En effet, la famille des protéines LNXs est étroitement liée à des mécanismes cellulaires importants tels que la prolifération et le cycle cellulaire. Dans mes travaux, j'ai révélé que la perturbation de l'activité glycinergique provoque un arrêt du cycle cellulaire dans les CSNs, provoquant ainsi une mort transitoire au début de la neurogenèse. De plus, dans une autre étude, nous avons démontré que la perturbation de l'activité glycinergique maintient la prolifération des CSNs durant la neurogenèse. Ces deux phénomènes peuvent être orchestrés par la surexpression du *lnx1* dans les CSNs durant la période de neurogenèse. Explorer cette hypothèse peut donc approfondir notre compréhension de l'implication de l'activité glycinergique dans des mécanismes cellulaires et dans le développement du SNC.

Dans un second aspect, LNX1 régule l'expression de NUMB. La distribution de cette protéine à l'intérieur des CSNs permet de définir leur division symétrique ou asymétrique durant la neurogenèse, et ainsi leur destinée. Examiner *in vivo* la distribution de NUMB dans les CSNs et la division de celles-ci lors de la perturbation de l'activité glycinergique peut apporter de nouveaux éléments dans la compréhension du maintien de la prolifération lors d'un dysfonctionnement de l'activité glycinergique.

## Bibliographie

- AAKU-SARASTE, E., HELFWIG, A. & HUTTNER, W. B. 1996. Loss of occludin and functional tight junctions, but not ZO-1, during neural tube closure--remodeling of the neuroepithelium prior to neurogenesis. *Dev Biol*, 180, 664-79.
- AHRENS, M. B., ORGER, M. B., ROBSON, D. N., LI, J. M. & KELLER, P. J. 2013. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nat Methods*, 10, 413-20.
- AIGNER, L. & BOGDAHN, U. 2008. TGF-beta in neural stem cells and in tumors of the central nervous system. *Cell Tissue Res*, 331, 225-41.
- AKINCI, M. A., TURNER, H., TAVERAS, M. & WOLOSIN, J. M. 2009. Differential gene expression in the pig limbal side population: implications for stem cell cycling, replication, and survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 5630-8.
- ALEXANDRE, P., REUGELS, A. M., BARKER, D., BLANC, E. & CLARKE, J. D. 2010. Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube. *Nat Neurosci*, 13, 673-9.
- ALLAIN, A. E., CAZENAVE, W., DELPY, A., EXERTIER, P., BARTHE, C., MEYRAND, P., CATTART, D. & BRANCHEREAU, P. 2016. Nonsynaptic glycine release is involved in the early KCC2 expression. *Dev Neurobiol*, 76, 764-79.
- ALTMAN, J. & DAS, G. D. 1965. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 207, 953-6.
- ANDANG, M., HJERLING-LEFFLER, J., MOLINER, A., LUNDGREN, T. K., CASTELO-BRANCO, G., NANOU, E., POZAS, E., BRYJA, V., HALLIEZ, S., NISHIMARU, H., WILBERTZ, J., ARENAS, E., KOLTZENBURG, M., CHARNAY, P., EL MANIRA, A., IBANEZ, C. F. & ERNFORS, P. 2008. Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature*, 451, 460-4.
- ANJARD, C. & LOOMIS, W. F. 2006. GABA induces terminal differentiation of Dictyostelium through a GABAB receptor. *Development*, 133, 2253-61.
- ARAI, Y., PULVERS, J. N., HAFFNER, C., SCHILLING, B., NUSSLEIN, I., CALEGARI, F. & HUTTNER, W. B. 2011. Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nat Commun*, 2, 154.
- ARMSTRONG, G. A., LIAO, M., YOU, Z., LISSOUBA, A., CHEN, B. E. & DRAPEAU, P. 2016. Homology Directed Knockin of Point Mutations in the Zebrafish *tardbp* and *fus* Genes in ALS Using the CRISPR/Cas9 System. *PLoS One*, 11, e0150188.
- ARNSTEIN, H. R. & NEUBERGER, A. 1953. The synthesis of glycine and serine by the rat. *Biochem J*, 55, 271-80.
- ASAKAWA, K. & KAWAKAMI, K. 2008. Targeted gene expression by the Gal4-UAS system in zebrafish. *Dev Growth Differ*, 50, 391-9.
- AVILA, A., VIDAL, P. M., DEAR, T. N., HARVEY, R. J., RIGO, J. M. & NGUYEN, L. 2013. Glycine receptor alpha2 subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep*, 4, 738-50.
- AVILA, A., VIDAL, P. M., TIELENS, S., MORELLI, G., LAGUESSE, S., HARVEY, R. J., RIGO, J. M. & NGUYEN, L. 2014. Glycine receptors control the generation of projection neurons in the developing cerebral cortex. *Cell Death Differ*, 21, 1696-708.



- BAKER, S. A., BAKER, K. A. & HAGG, T. 2004. Dopaminergic nigrostriatal projections regulate neural precursor proliferation in the adult mouse subventricular zone. *Eur J Neurosci*, 20, 575-9.
- BARONE, V., BICZYNSKI, M., BLOINO, J. & PUZZARINI, C. 2013. Glycine conformers: a never-ending story? *Phys Chem Chem Phys*, 15, 1358-63.
- BATTLE, H. I. & HISAOKA, K. K. 1952. Effects of ethyl carbamate (urethan) on the early development of the teleost *Brachydanio rerio*. *Cancer Res*, 12, 334-40.
- BECKER, C. M. 1990. Disorders of the inhibitory glycine receptor: the spastic mouse. *FASEB J*, 4, 2767-74.
- BEKRI, A., BILLAUD, M. & THELU, J. 2014. Analysis of NUA1 and NUA2 expression during early chick development reveals specific patterns in the developing head. *Int J Dev Biol*, 58, 379-84.
- BEKRI, A. & DRAPEAU, P. 2018. Glycine Promotes the Survival of a Subpopulation of Neural Stem Cells. *Front Cell Dev Biol*, 6, 68.
- BEKRI, A., LIAO, M. & DRAPEAU, P. 2019. Glycine Regulates Neural Stem Cell Proliferation During Development via Lnx1-Dependent Notch Signaling. *Front Mol Neurosci*, 12, 44.
- BEN-ARI, Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci*, 3, 728-39.
- BERNARDOS, R. L. & RAYMOND, P. A. 2006a. GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr Patterns*, 6, 1007-13.
- BERNARDOS, R. L. & RAYMOND, P. A. 2006b. GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr Patterns*, 6, 1007-13.
- BETZ, H. 1991. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends Neurosci*, 14, 458-61.
- BETZ, H., GOMEZA, J., ARMSSEN, W., SCHOLZE, P. & EULENBURG, V. 2006. Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem Soc Trans*, 34, 55-8.
- BLOM, T., ROSELLI, A., TANNER, M. & NUPPONEN, N. N. 2008. Mutation and copy number analysis of LNX1 and Numbl in nervous system tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 186, 103-9.
- BODE, A. & LYNCH, J. W. 2014. The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol Brain*, 7, 2.
- BONAGUIDI, M. A., WHEELER, M. A., SHAPIRO, J. S., STADEL, R. P., SUN, G. J., MING, G. L. & SONG, H. 2011. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 145, 1142-55.
- BORMANN, J., RUNDSTROM, N., BETZ, H. & LANGOSCH, D. 1993. Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J*, 12, 3729-37.
- BRUCK, R., WARDI, J., AEED, H., AVNI, Y., SHIRIN, H., AVINOACH, I., SHAHMUROV, M. & HERSHKOVIZ, R. 2003. Glycine modulates cytokine secretion, inhibits hepatic damage and improves survival in a model of endotoxemia in mice. *Liver Int*, 23, 276-82.

- BRUSTEIN, E., COTE, S., GHISLAIN, J. & DRAPEAU, P. 2013. Spontaneous glycine-induced calcium transients in spinal cord progenitors promote neurogenesis. *Dev Neurobiol*, 73, 168-75.
- BULTJE, R. S., CASTANEDA-CASTELLANOS, D. R., JAN, L. Y., JAN, Y. N., KRIEGSTEIN, A. R. & SHI, S. H. 2009. Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via notch signaling in the developing neocortex. *Neuron*, 63, 189-202.
- BURZOMATO, V., GROOT-KORMELINK, P. J., SIVILOTTI, L. G. & BEATO, M. 2003. Stoichiometry of recombinant heteromeric glycine receptors revealed by a pore-lining region point mutation. *Receptors Channels*, 9, 353-61.
- CAHOY, J. D., EMERY, B., KAUSHAL, A., FOO, L. C., ZAMANIAN, J. L., CHRISTOPHERSON, K. S., XING, Y., LUBISCHER, J. L., KRIEG, P. A., KRUPENKO, S. A., THOMPSON, W. J. & BARRES, B. A. 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci*, 28, 264-78.
- CAI, J., SCHLEIDT, S., PELTA-HELLER, J., HUTCHINGS, D., CANNARSA, G. & IACOVITTI, L. 2013. BMP and TGF-beta pathway mediators are critical upstream regulators of Wnt signaling during midbrain dopamine differentiation in human pluripotent stem cells. *Dev Biol*, 376, 62-73.
- CAMPBELL, W. A., YANG, H., ZETTERBERG, H., BAULAC, S., SEARS, J. A., LIU, T., WONG, S. T., ZHONG, T. P. & XIA, W. 2006. Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen-2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. *J Neurochem*, 96, 1423-40.
- CHAN, T. A., HERMEKING, H., LENGAUER, C., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1999. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, 401, 616-20.
- CHEN, H. L., YUH, C. H. & WU, K. K. 2010. Nestin is essential for zebrafish brain and eye development through control of progenitor cell apoptosis. *PLoS One*, 5, e9318.
- CHEN, J., XU, J., ZHAO, W., HU, G., CHENG, H., KANG, Y., XIE, Y. & LU, Y. 2005. Characterization of human LNX, a novel ligand of Numb protein X that is downregulated in human gliomas. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, 2273-83.
- CHEYMOL, J. 1972. [In 1921, 50 years ago, Otto Loewi proved the existence of chemical mediators of the nervous system]. *Therapie*, 27, 57-65.
- CHI, Z., ZHANG, J., TOKUNAGA, A., HARRAZ, M. M., BYRNE, S. T., DOLINKO, A., XU, J., BLACKSHAW, S., GAIANO, N., DAWSON, T. M. & DAWSON, V. L. 2012. Botch promotes neurogenesis by antagonizing Notch. *Dev Cell*, 22, 707-20.
- CICERO, S. & HERRUP, K. 2005. Cyclin-dependent kinase 5 is essential for neuronal cell cycle arrest and differentiation. *J Neurosci*, 25, 9658-68.
- COLALUCA, I. N., TOSONI, D., NUCIFORO, P., SENIC-MATUGLIA, F., GALIMBERTI, V., VIALE, G., PECE, S. & DI FIORE, P. P. 2008. NUMB controls p53 tumour suppressor activity. *Nature*, 451, 76-80.
- CONG, L., RAN, F. A., COX, D., LIN, S., BARRETTO, R., HABIB, N., HSU, P. D., WU, X., JIANG, W., MARRAFFINI, L. A. & ZHANG, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819-23.

- CORBEIL, D., MARZESCO, A. M., WILSCH-BRAUNINGER, M. & HUTTNER, W. B. 2010. The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. *FEBS Lett*, 584, 1659-64.
- COSTA, M. R., WEN, G., LEPIER, A., SCHROEDER, T. & GOTZ, M. 2008. Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex. *Development*, 135, 11-22.
- COTE, S. & DRAPEAU, P. 2012. Regulation of spinal interneuron differentiation by the paracrine action of glycine. *Dev Neurobiol*, 72, 208-14.
- CUI, W. W., LOW, S. E., HIRATA, H., SAINT-AMANT, L., GEISLER, R., HUME, R. I. & KUWADA, J. Y. 2005. The zebrafish shocked gene encodes a glycine transporter and is essential for the function of early neural circuits in the CNS. *J Neurosci*, 25, 6610-20.
- DAI, Z. L., LI, X. L., XI, P. B., ZHANG, J., WU, G. & ZHU, W. Y. 2012. Metabolism of select amino acids in bacteria from the pig small intestine. *Amino Acids*, 42, 1597-608.
- DAI, Z. L., ZHANG, J., WU, G. & ZHU, W. Y. 2010. Utilization of amino acids by bacteria from the pig small intestine. *Amino Acids*, 39, 1201-15.
- DAS, R. M. & STOREY, K. G. 2014. Apical abscission alters cell polarity and dismantles the primary cilium during neurogenesis. *Science*, 343, 200-4.
- DAVE, R. K., ELLIS, T., TOUMPAS, M. C., ROBSON, J. P., JULIAN, E., ADOLPHE, C., BARTLETT, P. F., COOPER, H. M., REYNOLDS, B. A. & WAINWRIGHT, B. J. 2011. Sonic hedgehog and notch signaling can cooperate to regulate neurogenic divisions of neocortical progenitors. *PLoS One*, 6, e14680.
- DAVIES, J. S., CHUNG, S. K., THOMAS, R. H., ROBINSON, A., HAMMOND, C. L., MULLINS, J. G., CARTA, E., PEARCE, B. R., HARVEY, K., HARVEY, R. J. & REES, M. I. 2010. The glycinergic system in human startle disease: a genetic screening approach. *Front Mol Neurosci*, 3, 8.
- DE BIE, P. & CIECHANOVER, A. 2011. Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Cell Death Differ*, 18, 1393-402.
- DE KONING, T. J., SNELL, K., DURAN, M., BERGER, R., POLL-THE, B. T. & SURTEES, R. 2003. L-serine in disease and development. *Biochem J*, 371, 653-61.
- DE LA ROCHA-MUÑOZ, A., NÚÑEZ, E., ARRIBAS-GONZÁLEZ, E., LÓPEZ-CORCUERA, B., ARAGÓN, C. & DE JUAN-SANZ, J. 2019. E3 ubiquitin ligases LNX1 and LNX2 are major regulators of the presynaptic glycine transporter GlyT2. *Scientific Reports*, 9, 14944.
- DEHAY, C. & KENNEDY, H. 2007. Cell-cycle control and cortical development. *Nat Rev Neurosci*, 8, 438-50.
- DEL BENE, F., WEHMAN, A. M., LINK, B. A. & BAIER, H. 2008. Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal notch gradient. *Cell*, 134, 1055-65.

- DEMARQUE, M., REPRESA, A., BECQ, H., KHALILOV, I., BEN-ARI, Y. & ANIKSZTEJN, L. 2002. Paracrine intercellular communication by a Ca<sup>2+</sup>- and SNARE-independent release of GABA and glutamate prior to synapse formation. *Neuron*, 36, 1051-61.
- DEVIGNOT, V., PRADO DE CARVALHO, L., BREGESTOVSKI, P. & GOBLET, C. 2003. A novel glycine receptor alpha Z1 subunit variant in the zebrafish brain. *Neuroscience*, 122, 449-57.
- DHO, S. E., JACOB, S., WOLTING, C. D., FRENCH, M. B., ROHRSCHEIDER, L. R. & MCGLADE, C. J. 1998. The mammalian numb phosphotyrosine-binding domain. Characterization of binding specificity and identification of a novel PDZ domain-containing numb binding protein, LNX. *J Biol Chem*, 273, 9179-87.
- DI MARCOTULLIO, L., GRECO, A., MAZZA, D., CANETTIERI, G., PIETROSANTI, L., INFANTE, P., CONI, S., MORETTI, M., DE SMAELE, E., FERRETTI, E., SCREPANTI, I. & GULINO, A. 2011. Numb activates the E3 ligase Itch to control Gli1 function through a novel degradation signal. *Oncogene*, 30, 65-76.
- DONG, Z., YANG, N., YEO, S. Y., CHITNIS, A. & GUO, S. 2012. Intralineaage directional Notch signaling regulates self-renewal and differentiation of asymmetrically dividing radial glia. *Neuron*, 74, 65-78.
- DOYON, Y., MCCAMMON, J. M., MILLER, J. C., FARAJI, F., NGO, C., KATIBAH, G. E., AMORA, R., HOCKING, T. D., ZHANG, L., REBAR, E. J., GREGORY, P. D., URNOV, F. D. & AMACHER, S. L. 2008. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 26, 702-8.
- DU, J., LU, W., WU, S., CHENG, Y. & GOUAUX, E. 2015. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature*, 526, 224-9.
- EICHLER, S. A., KIRISCHUK, S., JUTTNER, R., SCHAEFERMEIER, P. K., LEGENDRE, P., LEHMANN, T. N., GLOVELI, T., GRANTYN, R. & MEIER, J. C. 2008. Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *J Cell Mol Med*, 12, 2848-66.
- EL-BROLOS, M. A., KONTARAKIS, Z., ROSSI, A., KUENNE, C., GUNTHER, S., FUKUDA, N., KIKHI, K., BOEZIO, G. L. M., TAKACS, C. M., LAI, S. L., FUKUDA, R., GERRI, C., GIRALDEZ, A. J. & STAINIER, D. Y. R. 2019. Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature*, 568, 193-197.
- EL-DEIRY, W. S., TOKINO, T., VELCULESCU, V. E., LEVY, D. B., PARSONS, R., TRENT, J. M., LIN, D., MERCER, W. E., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817-25.
- ENDO, A. & INGALLS, T. H. 1968. Chromosomes of the zebra fish. A model for cytogenetic, embryologic, and ecologic study. *J Hered*, 59, 382-4.
- EVELLIN, S., GALVAGNI, F., ZIPPO, A., NERI, F., ORLANDINI, M., INCARNATO, D., DETTORI, D., NEUBAUER, S., KESSLER, H., WAGNER, E. F. & OLIVIERO, S. 2013. FOSL1 controls the assembly of endothelial cells into capillary tubes by direct repression of  $\alpha$ v and  $\beta$ 3 integrin transcription. *Mol Cell Biol*, 33, 1198-209.
- FAIGLE, R. & SONG, H. 2013. Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 2435-48.

- FENG, J., CRADDOCK, N., JONES, I. R., COOK, E. H., JR., GOLDMAN, D., HESTON, L. L., PELTONEN, L., DELISI, L. E. & SOMMER, S. S. 2001. Systematic screening for mutations in the glycine receptor alpha2 subunit gene (GLRA2) in patients with schizophrenia and other psychiatric diseases. *Psychiatr Genet*, 11, 45-8.
- FIETZ, S. A., KELAVA, I., VOGT, J., WILSCH-BRAUNINGER, M., STENZEL, D., FISH, J. L., CORBEIL, D., RIEHN, A., DISTLER, W., NITSCH, R. & HUTTNER, W. B. 2010. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat Neurosci*, 13, 690-9.
- FLYNN, M., SAHA, O. & YOUNG, P. 2011. Molecular evolution of the LNX gene family. *BMC Evol Biol*, 11, 235.
- FOISNER, R. 1997. Dynamic organisation of intermediate filaments and associated proteins during the cell cycle. *Bioessays*, 19, 297-305.
- FRANEK, F., FISMOLOVA, I. & ECKSCHLAGER, T. 2002. Antiapoptotic and proapoptotic action of various amino acids and analogs in starving MOLT-4 cells. *Arch Biochem Biophys*, 398, 141-6.
- FROH, M., THURMAN, R. G. & WHEELER, M. D. 2002. Molecular evidence for a glycine-gated chloride channel in macrophages and leukocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283, G856-63.
- FUJITA, M., SATO, K., SATO, M., INOUE, T., KOZUKA, T. & TOHYAMA, M. 1991. Regional distribution of the cells expressing glycine receptor beta subunit mRNA in the rat brain. *Brain Res*, 560, 23-37.
- GARNEAU, J. E., DUPUIS, M. E., VILLION, M., ROMERO, D. A., BARRANGOU, R., BOYAVAL, P., FREMAUX, C., HORVATH, P., MAGADAN, A. H. & MOINEAU, S. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468, 67-71.
- GOMEZ, G. A., PRASAD, M. S., WONG, M., CHARNEY, R. M., SHELAR, P. B., SANDHU, N., HACKLAND, J. O. S., HERNANDEZ, J. C., LEUNG, A. W. & GARCIA-CASTRO, M. I. 2019. WNT/beta-catenin modulates the axial identity of embryonic stem cell-derived human neural crest. *Development*, 146.
- GOMEZA, J., HULSMANN, S., OHNO, K., EULENBURG, V., SZOKE, K., RICHTER, D. & BETZ, H. 2003a. Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron*, 40, 785-96.
- GOMEZA, J., OHNO, K., HULSMANN, S., ARMSSEN, W., EULENBURG, V., RICHTER, D. W., LAUBE, B. & BETZ, H. 2003b. Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron*, 40, 797-806.
- GOTZ, M. 2003. Glial cells generate neurons--master control within CNS regions: developmental perspectives on neural stem cells. *Neuroscientist*, 9, 379-97.
- GOTZ, M. & HUTTNER, W. B. 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 777-88.
- GREENWALD, I. & RUBIN, G. M. 1992. Making a difference: the role of cell-cell interactions in establishing separate identities for equivalent cells. *Cell*, 68, 271-81.

- GRIGOR'EVA, Y. S. & GLAZOVA, M. V. 2015. The Role of p53 in the Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells in Organotypic Cultures of Mouse Hippocampus  
. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 45, 627-636.
- GRUDZINSKA, J., SCHEMM, R., HAEGER, S., NICKE, A., SCHMALZING, G., BETZ, H. & LAUBE, B. 2005. The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron*, 45, 727-39.
- GUO, W., ZHANG, L., CHRISTOPHER, D. M., TENG, Z. Q., FAUSETT, S. R., LIU, C., GEORGE, O. L., KLINGENSMITH, J., JIN, P. & ZHAO, X. 2011. RNA-binding protein FXR2 regulates adult hippocampal neurogenesis by reducing Noggin expression. *Neuron*, 70, 924-38.
- HAFFTER, P., ODENTHAL, J., MULLINS, M. C., LIN, S., FARRELL, M. J., VOGELSANG, E., HAAS, F., BRAND, M., VAN EEDEN, F. J., FURUTANI-SEIKI, M., GRANATO, M., HAMMERSCHMIDT, M., HEISENBERG, C. P., JIANG, Y. J., KANE, D. A., KELSH, R. N., HOPKINS, N. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. 1996. Mutations affecting pigmentation and shape of the adult zebrafish. *Dev Genes Evol*, 206, 260-76.
- HALL, J. C. 1998. Glycine. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 22, 393-8.
- HAMILTON, F. 1822. *An account of the fishes found in the river Ganges and its branches*, Edinburgh ;, Printed for A. Constable and company; [etc., etc.].
- HANDFORD, C. A., LYNCH, J. W., BAKER, E., WEBB, G. C., FORD, J. H., SUTHERLAND, G. R. & SCHOFIELD, P. R. 1996. The human glycine receptor beta subunit: primary structure, functional characterisation and chromosomal localisation of the human and murine genes. *Brain Res Mol Brain Res*, 35, 211-9.
- HARTSHORNE, D. & GREENBERG, D. M. 1964. Studies on Liver Threonine Dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, 105, 173-8.
- HARVEY, R. J., DEPNER, U. B., WASSLE, H., AHMADI, S., HEINDL, C., REINOLD, H., SMART, T. G., HARVEY, K., SCHUTZ, B., ABO-SALEM, O. M., ZIMMER, A., POISBEAU, P., WELZL, H., WOLFER, D. P., BETZ, H., ZEILHOFER, H. U. & MULLER, U. 2004. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*, 304, 884-7.
- HARVEY, R. J., TOPF, M., HARVEY, K. & REES, M. I. 2008. The genetics of hyperekplexia: more than startle! *Trends Genet*, 24, 439-47.
- HATAKEYAMA, J., BESSHO, Y., KATOH, K., OOKAWARA, S., FUJIOKA, M., GUILLEMOT, F. & KAGEYAMA, R. 2004. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*, 131, 5539-50.
- HEINZE, L., HARVEY, R. J., HAVERKAMP, S. & WASSLE, H. 2007. Diversity of glycine receptors in the mouse retina: localization of the alpha4 subunit. *J Comp Neurol*, 500, 693-707.
- HENSLEY, M. R., EMRAN, F., BONILLA, S., ZHANG, L., ZHONG, W., GROSU, P., DOWLING, J. E. & LEUNG, Y. F. 2011. Cellular expression of Smarca4 (Brg1)-regulated genes in zebrafish retinas. *BMC Dev Biol*, 11, 45.

- HIRATA, H., OGINO, K., YAMADA, K., LEACOCK, S. & HARVEY, R. J. 2013. Defective escape behavior in DEAH-box RNA helicase mutants improved by restoring glycine receptor expression. *J Neurosci*, 33, 14638-44.
- HIRATA, H., SAINT-AMANT, L., DOWNES, G. B., CUI, W. W., ZHOU, W., GRANATO, M. & KUWADA, J. Y. 2005. Zebrafish bandoneon mutants display behavioral defects due to a mutation in the glycine receptor beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8345-50.
- HISANO, Y., INOUE, A., TAIMATSU, K., OTA, S., OHGA, R., KOTANI, H., MURAKI, M., AOKI, J. & KAWAHARA, A. 2015. Comprehensive analysis of sphingosine-1-phosphate receptor mutants during zebrafish embryogenesis. *Genes Cells*, 20, 647-58.
- HOCH, W., BETZ, H. & BECKER, C. M. 1989. Primary cultures of mouse spinal cord express the neonatal isoform of the inhibitory glycine receptor. *Neuron*, 3, 339-48.
- HU, T., YANG, H. & HAN, Z. G. 2015. PDZRN4 acts as a suppressor of cell proliferation in human liver cancer cell lines. *Cell Biochem Funct*, 33, 443-9.
- HUANG DA, W., SHERMAN, B. T. & LEMPICKI, R. A. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4, 44-57.
- IKEJIMA, K., IIMURO, Y., FORMAN, D. T. & THURMAN, R. G. 1996. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am J Physiol*, 271, G97-103.
- IKEJIMA, K., QU, W., STACHLEWITZ, R. F. & THURMAN, R. G. 1997. Kupffer cells contain a glycine-gated chloride channel. *Am J Physiol*, 272, G1581-6.
- IMAYOSHI, I., ISHIDATE, F. & KAGEYAMA, R. 2015. Real-time imaging of bHLH transcription factors reveals their dynamic control in the multipotency and fate choice of neural stem cells. *Front Cell Neurosci*, 9, 288.
- IMAYOSHI, I., SHIMOJO, H., SAKAMOTO, M., OHTSUKA, T. & KAGEYAMA, R. 2013. Genetic visualization of notch signaling in mammalian neurogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 70, 2045-57.
- IMBODEN, M., DEVIGNOT, V. & GOBLET, C. 2001. Phylogenetic relationships and chromosomal location of five distinct glycine receptor subunit genes in the teleost *Danio rerio*. *Dev Genes Evol*, 211, 415-22.
- ITO, Y., MORIYAMA, Y., HASEGAWA, T., ENDO, T. A., TOYODA, T. & GOTOH, Y. 2013. Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism. *Nat Neurosci*, 16, 416-25.
- JACKSON, A. A. 1991. The glycine story. *Eur J Clin Nutr*, 45, 59-65.
- JESSELL, T. M. 2000. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*, 1, 20-9.
- KAGEYAMA, R., OHTSUKA, T. & KOBAYASHI, T. 2007. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development*, 134, 1243-51.
- KAGEYAMA, R., SHIMOJO, H. & OHTSUKA, T. 2018. Dynamic control of neural stem cells by bHLH factors. *Neurosci Res*.

- KALANI, M. Y., CHESHER, S. H., CORD, B. J., BABABEYGY, S. R., VOGEL, H., WEISSMAN, I. L., PALMER, T. D. & NUSSE, R. 2008. Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 16970-5.
- KANDACHAR, V. & ROEGIERS, F. 2012. Endocytosis and control of Notch signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 24, 534-40.
- KARLSSON, J., VON HOFSTEN, J. & OLSSON, P. E. 2001. Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar Biotechnol (NY)*, 3, 522-7.
- KAWAGUCHI, D., FURUTACHI, S., KAWAI, H., HOZUMI, K. & GOTOH, Y. 2013. Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nat Commun*, 4, 1880.
- KAWAKAMI, K. 2005. Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev Dyn*, 234, 244-54.
- KIM, C. H., UESHIMA, E., MURAOKA, O., TANAKA, H., YEO, S. Y., HUH, T. L. & MIKI, N. 1996. Zebrafish elav/HuC homologue as a very early neuronal marker. *Neurosci Lett*, 216, 109-12.
- KIM, J. S., KIM, J., KIM, Y., YANG, M., JANG, H., KANG, S., KIM, J. C., KIM, S. H., SHIN, T. & MOON, C. 2011. Differential patterns of nestin and glial fibrillary acidic protein expression in mouse hippocampus during postnatal development. *J Vet Sci*, 12, 1-6.
- KIM, K. K., NAM, J., MUKOUYAMA, Y. S. & KAWAMOTO, S. 2013. Rbfox3-regulated alternative splicing of Numb promotes neuronal differentiation during development. *J Cell Biol*, 200, 443-58.
- KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R., ULLMANN, B. & SCHILLING, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*, 203, 253-310.
- KIMMEL, C. B., WARGA, R. M. & SCHILLING, T. F. 1990. Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development*, 108, 581-94.
- KIMURA, Y., KAWAWAKI, J., KAKIYAMA, Y., SHIMODA, A. & TANAKA, K. 2014. The ESCRT-III adaptor protein Bro1 controls functions of regulator for free ubiquitin chains 1 (Rfu1) in ubiquitin homeostasis. *J Biol Chem*, 289, 21760-9.
- KLING, C., KOCH, M., SAUL, B. & BECKER, C. M. 1997. The frameshift mutation oscillator (Gla1(sp1-ot)) produces a complete loss of glycine receptor alpha1-polypeptide in mouse central nervous system. *Neuroscience*, 78, 411-7.
- KORNACK, D. R. & RAKIC, P. 1999. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5768-73.
- KOSODO, Y., ROPER, K., HAUBENSAK, W., MARZESCO, A. M., CORBEIL, D. & HUTTNER, W. B. 2004. Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells. *EMBO J*, 23, 2314-24.
- KRIEGSTEIN, A. & ALVAREZ-BUYLLA, A. 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, 32, 149-84.
- KRIEGSTEIN, A. R. & GOTZ, M. 2003. Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia*, 43, 37-43.
- KUHSE, J., BETZ, H. & KIRSCH, J. 1995. The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr Opin Neurobiol*, 5, 318-23.



- KUHSE, J., KURYATOV, A., MAULET, Y., MALOSIO, M. L., SCHMIEDEN, V. & BETZ, H. 1991. Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Lett*, 283, 73-7.
- KUHSE, J., LAUBE, B., MAGALEI, D. & BETZ, H. 1993. Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron*, 11, 1049-56.
- KUKEKOV, V. G., LAYWELL, E. D., SUSLOV, O., DAVIES, K., SCHEFFLER, B., THOMAS, L. B., O'BRIEN, T. F., KUSAKABE, M. & STEINDLER, D. A. 1999. Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol*, 156, 333-44.
- KUMAR, P. & MEIZEL, S. 2008. Identification and spatial distribution of glycine receptor subunits in human sperm. *Reproduction*, 136, 387-90.
- KUSEK, G., CAMPBELL, M., DOYLE, F., TENENBAUM, S. A., KIEBLER, M. & TEMPLE, S. 2012. Asymmetric segregation of the double-stranded RNA binding protein Staufin2 during mammalian neural stem cell divisions promotes lineage progression. *Cell Stem Cell*, 11, 505-16.
- KUWAHARA, A., HIRABAYASHI, Y., KNOEPFLER, P. S., TAKETO, M. M., SAKAI, J., KODAMA, T. & GOTOH, Y. 2010. Wnt signaling and its downstream target N-myc regulate basal progenitors in the developing neocortex. *Development*, 137, 1035-44.
- LABONNE, J. D., GRAVES, T. D., SHEN, Y., JONES, J. R., KONG, I. K., LAYMAN, L. C. & KIM, H. G. 2016. A microdeletion at Xq22.2 implicates a glycine receptor GLRA4 involved in intellectual disability, behavioral problems and craniofacial anomalies. *BMC Neurol*, 16, 132.
- LABRUDE, P. & BECQ, C. 2003. [Pharmacist and chemist Henri Braconnot]. *Rev Hist Pharm (Paris)*, 51, 61-78.
- LANGOSCH, D., THOMAS, L. & BETZ, H. 1988. Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7394-8.
- LAUBE, B., MAKSAY, G., SCHEMM, R. & BETZ, H. 2002. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci*, 23, 519-27.
- LESAGE, B., GUTIERREZ, I., MARTI, E. & GONZALEZ, C. 2010. Neural stem cells: the need for a proper orientation. *Curr Opin Genet Dev*, 20, 438-42.
- LEWIS, R. M., GODFREY, K. M., JACKSON, A. A., CAMERON, I. T. & HANSON, M. A. 2005. Low serine hydroxymethyltransferase activity in the human placenta has important implications for fetal glycine supply. *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 1594-8.
- LI, J., WANG, R., YANG, L., WU, Q., WANG, Q., NIE, Z., YU, Y., MA, J. & PAN, Q. 2015. Knockdown of Nestin inhibits proliferation and migration of colorectal cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 8, 6377-86.
- LIN, M. S., XIONG, W. C., LI, S. J., GONG, Z., CAO, X., KUANG, X. J., ZHANG, Y., GAO, T. M., MECHAWAR, N., LIU, C. & ZHU, X. H. 2017. alpha2-glycine receptors modulate adult hippocampal neurogenesis and spatial memory. *Dev Neurobiol*, 77, 1430-1441.

- LIU, A. & NISWANDER, L. A. 2005. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci*, 6, 945-54.
- LIU, Q. & WONG-RILEY, M. T. 2013. Postnatal development of glycine receptor subunits alpha1, alpha2, alpha3, and beta immunoreactivity in multiple brain stem respiratory-related nuclear groups of the rat. *Brain Res*, 1538, 1-16.
- LLANOS, M. N., RONCO, A. M., AGUIRRE, M. C. & MEIZEL, S. 2001. Hamster sperm glycine receptor: evidence for its presence and involvement in the acrosome reaction. *Mol Reprod Dev*, 58, 205-15.
- LOW, S. E., ITO, D. & HIRATA, H. 2018. Characterization of the Zebrafish Glycine Receptor Family Reveals Insights Into Glycine Receptor Structure Function and Stoichiometry. *Front Mol Neurosci*, 11, 286.
- LYNCH, J. W. 2004. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev*, 84, 1051-95.
- LYNCH, J. W. 2009. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*, 56, 303-9.
- MA, J., SUN, F., LI, C., ZHANG, Y., XIAO, W., LI, Z., PAN, Q., ZENG, H., XIAO, G., YAO, K., HONG, A. & AN, J. 2014. Depletion of intermediate filament protein Nestin, a target of microRNA-940, suppresses tumorigenesis by inducing spontaneous DNA damage accumulation in human nasopharyngeal carcinoma. *Cell Death Dis*, 5, e1377.
- MA, L., WANG, L., SHAN, Y., NAFEEES, M., IHAB, E., ZHANG, R., WANG, F. & YIN, W. 2017. Suppression of cancer stemness by upregulating Ligand-of-Numb protein X1 in colorectal carcinoma. *PLoS One*, 12, e0188665.
- MALOSIO, M. L., MARQUEZE-POUEY, B., KUHSE, J. & BETZ, H. 1991. Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J*, 10, 2401-9.
- MARCHETTI, G., DE ARCANGELIS, A., PFISTER, V. & GEORGES-LABOUESSE, E. 2013. alpha6 integrin subunit regulates cerebellar development. *Cell Adh Migr*, 7, 325-32.
- MATHIEU, P., Piantanida, A. P. & PITOSI, F. 2010. Chronic expression of transforming growth factor-beta enhances adult neurogenesis. *Neuroimmunomodulation*, 17, 200-1.
- MATILLA, B., MAURIZ, J. L., CULEBRAS, J. M., GONZALEZ-GALLEG0, J. & GONZALEZ, P. 2002. [Glycine: a cell-protecting anti-oxidant nutrient]. *Nutr Hosp*, 17, 2-9.
- MCCRACKEN, L. M., LOWES, D. C., SALLING, M. C., CARREAU-VOLLMER, C., ODEAN, N. N., BLEDNOV, Y. A., BETZ, H., HARRIS, R. A. & HARRISON, N. L. 2017. Glycine receptor alpha3 and alpha2 subunits mediate tonic and exogenous agonist-induced currents in forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E7179-E7186.
- MCDEARMID, J. R., LIAO, M. & DRAPEAU, P. 2006. Glycine receptors regulate interneuron differentiation during spinal network development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 9679-84.
- MCGILL, M. A., DHO, S. E., WEINMASTER, G. & MCGLADE, C. J. 2009. Numb regulates post-endocytic trafficking and degradation of Notch1. *J Biol Chem*, 284, 26427-38.

- MELENDEZ-HEVIA, E., DE PAZ-LUGO, P., CORNISH-BOWDEN, A. & CARDENAS, M. L. 2009. A weak link in metabolism: the metabolic capacity for glycine biosynthesis does not satisfy the need for collagen synthesis. *J Biosci*, 34, 853-72.
- MELENDREZ, C. S. & MEIZEL, S. 1995. Studies of porcine and human sperm suggesting a role for a sperm glycine receptor/Cl<sup>-</sup> channel in the zona pellucida-initiated acrosome reaction. *Biol Reprod*, 53, 676-83.
- MERNER, N. D., CHANDLER, M. R., BOURASSA, C., LIANG, B., KHANNA, A. R., DION, P., ROULEAU, G. A. & KAHLE, K. T. 2015. Regulatory domain or CpG site variation in SLC12A5, encoding the chloride transporter KCC2, in human autism and schizophrenia. *Front Cell Neurosci*, 9, 386.
- MINE, J., TAKETANI, T., OTSUBO, S., KISHI, K. & YAMAGUCHI, S. 2013. A 14-year-old girl with hyperekplexia having GLRB mutations. *Brain Dev*, 35, 660-3.
- MIRA, H., ANDREU, Z., SUH, H., LIE, D. C., JESSBERGER, S., CONSIGLIO, A., SAN EMETERIO, J., HORTIGÜELA, R., MARQUÉS-TORREJÓN, M. A., NAKASHIMA, K., COLAK, D., GÖTZ, M., FARIÑAS, I. & GAGE, F. H. 2010. Signaling through BMPR-1A regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, 7, 78-89.
- MITROUSIS, N., TROPEPE, V. & HERMANSON, O. 2015. Post-Translational Modifications of Histones in Vertebrate Neurogenesis. *Front Neurosci*, 9, 483.
- MIZUGUCHI, R., KRIKS, S., CORDES, R., GOSSLER, A., MA, Q. & GOULDING, M. 2006. *Ascl1* and *Gsh1/2* control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons. *Nat Neurosci*, 9, 770-8.
- MOHLER, H. 2009. Role of GABAA receptors in cognition. *Biochem Soc Trans*, 37, 1328-33.
- MONGEON, R., GLEASON, M. R., MASINO, M. A., FETCHO, J. R., MANDEL, G., BREHM, P. & DALLMAN, J. E. 2008. Synaptic homeostasis in a zebrafish glial glycine transporter mutant. *J Neurophysiol*, 100, 1716-23.
- MORELLI, G., AVILA, A., RAVANIDIS, S., AOURZ, N., NEVE, R. L., SMOLDERS, I., HARVEY, R. J., RIGO, J. M., NGUYEN, L. & BRONE, B. 2017. Cerebral Cortical Circuitry Formation Requires Functional Glycine Receptors. *Cereb Cortex*, 27, 1863-1877.
- MULLINS, M. C., HAMMERSCHMIDT, M., HAFFTER, P. & NUSSLEIN-VOLHARD, C. 1994. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol*, 4, 189-202.
- MUNJI, R. N., CHOE, Y., LI, G., SIEGENTHALER, J. A. & PLEASURE, S. J. 2011. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J Neurosci*, 31, 1676-87.
- NASEVICIUS, A. & EKKER, S. C. 2000. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet*, 26, 216-20.
- NEELY, M. D., LITT, M. J., TIDBALL, A. M., LI, G. G., ABOUD, A. A., HOPKINS, C. R., CHAMBERLIN, R., HONG, C. C., ESS, K. C. & BOWMAN, A. B. 2012. DMH1, a highly selective small molecule BMP inhibitor promotes neurogenesis of hiPSCs: comparison of PAX6 and SOX1 expression during neural induction. *ACS Chem Neurosci*, 3, 482-91.

- NGUYEN, H., KERIMOGLU, C., PIROUZ, M., PHAM, L., KISZKA, K. A., SOKPOR, G., SAKIB, M. S., ROSENBUSCH, J., TEICHMANN, U., SEONG, R. H., STOYKOVA, A., FISCHER, A., STAIGER, J. F. & TUOC, T. 2018. Epigenetic Regulation by BAF Complexes Limits Neural Stem Cell Proliferation by Suppressing Wnt Signaling in Late Embryonic Development. *Stem Cell Reports*, 10, 1734-1750.
- NGUYEN, L., MALGRANGE, B., BELACHEW, S., ROGISTER, B., ROCHER, V., MOONEN, G. & RIGO, J. M. 2002. Functional glycine receptors are expressed by postnatal nestin-positive neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci*, 15, 1299-305.
- NIE, J., MCGILL, M. A., DERMER, M., DHO, S. E., WOLTING, C. D. & MCGLADE, C. J. 2002. LNX functions as a RING type E3 ubiquitin ligase that targets the cell fate determinant Numb for ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J*, 21, 93-102.
- NÚÑEZ E, A.-G. E., LÓPEZ-CORCUERA B, ARAGÓN C & DE JUAN-SANZ J 2017. Ubiquitin ligase LNX1 is a major regulator of glycine recapture by the presynaptic transporter GlyT2
- OHNO, S. 2001. Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 641-8.
- PALLAFACCHINA, G., FRANCOIS, S., REGNAULT, B., CZARNY, B., DIVE, V., CUMANO, A., MONTARRAS, D. & BUCKINGHAM, M. 2010. An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem Cell Res*, 4, 77-91.
- PALMA, V., LIM, D. A., DAHMANE, N., SANCHEZ, P., BRIONNE, T. C., HERZBERG, C. D., GITTON, Y., CARLETON, A., ALVAREZ-BUYLLA, A. & RUIZ I ALTABA, A. 2005. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development*, 132, 335-44.
- PARIDAEN, J. T. & HUTTNER, W. B. 2014. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep*, 15, 351-64.
- PARK, D., XIANG, A. P., MAO, F. F., ZHANG, L., DI, C. G., LIU, X. M., SHAO, Y., MA, B. F., LEE, J. H., HA, K. S., WALTON, N. & LAHN, B. T. 2010. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells*, 28, 2162-71.
- PARK, R., KIM, H., JANG, M., JO, D., PARK, Y. I., NAMKOONG, S., LEE, J. I., JANG, I. S. & PARK, J. 2019. LNX1 contributes to tumor growth by down-regulating p53 stability. *FASEB J*, fj201900366R.
- PATRIZIO, A., RENNER, M., PIZZARELLI, R., TRILLER, A. & SPECHT, C. G. 2017. Alpha subunit-dependent glycine receptor clustering and regulation of synaptic receptor numbers. *Sci Rep*, 7, 10899.
- PELLEGRINO, C., GUBKINA, O., SCHAEFER, M., BECQ, H., LUDWIG, A., MUKHTAROV, M., CHUDOTVOROVA, I., CORBY, S., SALYHA, Y., SALOZHIN, S., BREGESTOVSKI, P. & MEDINA, I. 2011. Knocking down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival. *J Physiol*, 589, 2475-96.
- PILORGE, M., FASSIER, C., LE CORRONC, H., POTEY, A., BAI, J., DE GOIS, S., DELABY, E., ASSOULINE, B., GUINCHAT, V., DEVILLARD, F., DELORME, R., NYGREN, G., RASTAM, M., MEIER, J. C., OTANI, S., CHEVAL, H., JAMES, V. M., TOPF, M., DEAR,

- T. N., GILLBERG, C., LEBOYER, M., GIROS, B., GAUTRON, S., HAZAN, J., HARVEY, R. J., LEGENDRE, P. & BETANCUR, C. 2015. Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism. *Mol Psychiatry*.
- PILORGE, M., FASSIER, C., LE CORRONC, H., POTEY, A., BAI, J., DE GOIS, S., DELABY, E., ASSOULINE, B., GUINCHAT, V., DEVILLARD, F., DELORME, R., NYGREN, G., RASTAM, M., MEIER, J. C., OTANI, S., CHEVAL, H., JAMES, V. M., TOPF, M., DEAR, T. N., GILLBERG, C., LEBOYER, M., GIROS, B., GAUTRON, S., HAZAN, J., HARVEY, R. J., LEGENDRE, P. & BETANCUR, C. 2016. Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism. *Mol Psychiatry*, 21, 936-45.
- POPOVA, E. 2014. ON-OFF Interactions in the Retina: Role of Glycine and GABA. *Curr Neuropharmacol*, 12, 509-26.
- POSTLETHWAIT, J. H., YAN, Y. L., GATES, M. A., HORNE, S., AMORES, A., BROWNLIE, A., DONOVAN, A., EGAN, E. S., FORCE, A., GONG, Z., GOUTEL, C., FRITZ, A., KELSH, R., KNAPIK, E., LIAO, E., PAW, B., RANSOM, D., SINGER, A., THOMSON, M., ABDULJABBAR, T. S., YELICK, P., BEIER, D., JOLY, J. S., LARHAMMAR, D., ROSA, F., WESTERFIELD, M., ZON, L. I., JOHNSON, S. L. & TALBOT, W. S. 1998. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat Genet*, 18, 345-9.
- PREGIZER, S., BARSKI, A., GERSBACH, C. A., GARCIA, A. J. & FRENKEL, B. 2007. Identification of novel Runx2 targets in osteoblasts: cell type-specific BMP-dependent regulation of Tram2. *J Cell Biochem*, 102, 1458-71.
- QI, R. B., ZHANG, J. Y., LU, D. X., WANG, H. D., WANG, H. H. & LI, C. J. 2007. Glycine receptors contribute to cytoprotection of glycine in myocardial cells. *Chin Med J (Engl)*, 120, 915-21.
- RAJENDRA, S., LYNCH, J. W., PIERCE, K. D., FRENCH, C. R., BARRY, P. H. & SCHOFIELD, P. R. 1995. Mutation of an arginine residue in the human glycine receptor transforms beta-alanine and taurine from agonists into competitive antagonists. *Neuron*, 14, 169-75.
- RAJENDRA, S., LYNCH, J. W. & SCHOFIELD, P. R. 1997. The glycine receptor. *Pharmacol Ther*, 73, 121-46.
- RAKIC, P. 1972. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol*, 145, 61-83.
- RAKIC, P. 2003. Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex*, 13, 541-9.
- RAMANATHAN, S., WOODROFFE, A., FLODMAN, P. L., MAYS, L. Z., HANOUNI, M., MODAHL, C. B., STEINBERG-EPSTEIN, R., BOCIAN, M. E., SPENCE, M. A. & SMITH, M. 2004. A case of autism with an interstitial deletion on 4q leading to hemizyosity for genes encoding for glutamine and glycine neurotransmitter receptor sub-units (AMPA 2, GLRA3, GLRB) and neuropeptide receptors NPY1R, NPY5R. *BMC Med Genet*, 5, 10.
- RASH, B. G., LIM, H. D., BREUNIG, J. J. & VACCARINO, F. M. 2011. FGF signaling expands embryonic cortical surface area by regulating Notch-dependent neurogenesis. *J Neurosci*, 31, 15604-17.

- REYNOLDS, A., BRUSTEIN, E., LIAO, M., MERCADO, A., BABILONIA, E., MOUNT, D. B. & DRAPEAU, P. 2008. Neurogenic role of the depolarizing chloride gradient revealed by global overexpression of KCC2 from the onset of development. *J Neurosci*, 28, 1588-97.
- REZAEI, R., WANG, W., WU, Z., DAI, Z., WANG, J. & WU, G. 2013. Biochemical and physiological bases for utilization of dietary amino acids by young Pigs. *J Anim Sci Biotechnol*, 4, 7.
- RICE, D. S., NORTH CUTT, G. M. & KURSCHNER, C. 2001. The Lnx family proteins function as molecular scaffolds for Numb family proteins. *Mol Cell Neurosci*, 18, 525-40.
- ROBU, M. E., LARSON, J. D., NASEVICIUS, A., BEIRAGHI, S., BRENNER, C., FARBER, S. A. & EKKER, S. C. 2007. p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet*, 3, e78.
- ROEGIERS, F. & JAN, Y. N. 2004. Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 195-205.
- ROSSI, A., KONTARAKIS, Z., GERRI, C., NOLTE, H., HOLPER, S., KRUGER, M. & STAINIER, D. Y. 2015. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*, 524, 230-3.
- ROUSSO, D. L., PEARSON, C. A., GABER, Z. B., MIQUELAJAUREGUI, A., LI, S., PORTERA-CAILLIAU, C., MORRISEY, E. E. & NOVITCH, B. G. 2012. Foxp-mediated suppression of N-cadherin regulates neuroepithelial character and progenitor maintenance in the CNS. *Neuron*, 74, 314-30.
- ROWITCH, D. H. & KRIEGSTEIN, A. R. 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*, 468, 214-22.
- RUIZ-MEANA, M., PINA, P., GARCIA-DORADO, D., RODRIGUEZ-SINOVAS, A., BARBA, I., MIRO-CASAS, E., MIRABET, M. & SOLER-SOLER, J. 2004. Glycine protects cardiomyocytes against lethal reoxygenation injury by inhibiting mitochondrial permeability transition. *J Physiol*, 558, 873-82.
- RUTKA, J. T., IVANCHUK, S., MONDAL, S., TAYLOR, M., SAKAI, K., DIRKS, P., JUN, P., JUNG, S., BECKER, L. E. & ACKERLEY, C. 1999. Co-expression of nestin and vimentin intermediate filaments in invasive human astrocytoma cells. *Int J Dev Neurosci*, 17, 503-15.
- SAADE, M., GUTIERREZ-VALLEJO, I., LE DREAU, G., RABADAN, M. A., MIGUEZ, D. G., BUCETA, J. & MARTI, E. 2013. Sonic hedgehog signaling switches the mode of division in the developing nervous system. *Cell Rep*, 4, 492-503.
- SAHARA, S. & O'LEARY, D. D. 2009. Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron*, 63, 48-62.
- SAHLGREN, C. M., PALLARI, H. M., HE, T., CHOU, Y. H., GOLDMAN, R. D. & ERIKSSON, J. E. 2006. A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO J*, 25, 4808-19.
- SAMARUT, E., BEKRI, A. & DRAPEAU, P. 2016. Transcriptomic Analysis of Purified Embryonic Neural Stem Cells from Zebrafish Embryos Reveals Signaling Pathways Involved in Glycine-Dependent Neurogenesis. *Front Mol Neurosci*, 9, 22.

- SANDER, J. D., CADE, L., KHAYTER, C., REYON, D., PETERSON, R. T., JOUNG, J. K. & YEH, J. R. 2011. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol*, 29, 697-8.
- SANGHVI-SHAH, R. & WEBER, G. F. 2017. Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Front Cell Dev Biol*, 5, 81.
- SAPIR, T., LEVY, T., KOZER, N., SHIN, I., ZAMOR, V., HAFFNER-KRAUSZ, R., MCGLADE, J. C. & REINER, O. 2017. Notch Activation by Shootin1 Opposing Activities on 2 Ubiquitin Ligases. *Cereb Cortex*, 1-14.
- SATO, K., KIYAMA, H. & TOHYAMA, M. 1992. Regional distribution of cells expressing glycine receptor alpha 2 subunit mRNA in the rat brain. *Brain Res*, 590, 95-108.
- SATO, Y., SON, J. H. & MEIZEL, S. 2000. The mouse sperm glycine receptor/chloride channel: cellular localization and involvement in the acrosome reaction initiated by glycine. *J Androl*, 21, 99-106.
- SCAIN, A. L., LE CORRONC, H., ALLAIN, A. E., MULLER, E., RIGO, J. M., MEYRAND, P., BRANCHEREAU, P. & LEGENDRE, P. 2010. Glycine release from radial cells modulates the spontaneous activity and its propagation during early spinal cord development. *J Neurosci*, 30, 390-403.
- SCHEMMER, P., BRADFORD, B. U., ROSE, M. L., BUNZENDAHL, H., RALEIGH, J. A., LEMASTERS, J. J. & THURMAN, R. G. 1999. Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. *Am J Physiol*, 276, G924-32.
- SCHMIDT, R., STRAHLE, U. & SCHOLPP, S. 2013. Neurogenesis in zebrafish - from embryo to adult. *Neural Dev*, 8, 3.
- SHEMIN, D. 1946. The biological conversion of l-serine to glycine. *J Biol Chem*, 162, 297-307.
- SHI, A. M., TAO, Z. Q., WANG, X. & WANG, Y. Q. 2016. Intermediate filament Nestin and the cell motility in cancer - a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 20, 3514.
- SHIKATA, Y., OKADA, T., HASHIMOTO, M., ELLIS, T., MATSUMARU, D., SHIROISHI, T., OGAWA, M., WAINWRIGHT, B. & MOTOYAMA, J. 2011. Ptch1-mediated dosage-dependent action of Shh signaling regulates neural progenitor development at late gestational stages. *Dev Biol*, 349, 147-59.
- SHIMIZU, T., NAKAZAWA, M., KANI, S., BAE, Y. K., SHIMIZU, T., KAGEYAMA, R. & HIBI, M. 2010. Zinc finger genes Fezf1 and Fezf2 control neuronal differentiation by repressing Hes5 expression in the forebrain. *Development*, 137, 1875-85.
- SIMON, J., WAKIMOTO, H., FUJITA, N., LALANDE, M. & BARNARD, E. A. 2004. Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem*, 279, 41422-35.
- SOBETZKO, D., SANDER, T. & BECKER, C. M. 2001. Genetic variation of the human glycine receptor subunit genes GLRA3 and GLRB and susceptibility to idiopathic generalized epilepsies. *Am J Med Genet*, 105, 534-8.
- SOLOWAY, S. & STETTEN, D., JR. 1953. The metabolism of choline and its conversion to glycine in the rat. *J Biol Chem*, 204, 207-14.
- SORRELLS, S., TORUNO, C., STEWART, R. A. & JETTE, C. 2013. Analysis of apoptosis in zebrafish embryos by whole-mount immunofluorescence to detect activated Caspase 3. *J Vis Exp*, e51060.

- SPEAR, P. C. & ERICKSON, C. A. 2012. Apical movement during interkinetic nuclear migration is a two-step process. *Dev Biol*, 370, 33-41.
- SPITZER, N. C. 2006. Electrical activity in early neuronal development. *Nature*, 444, 707-12.
- STACHLEWITZ, R. F., LI, X., SMITH, S., BUNZENDAHL, H., GRAVES, L. M. & THURMAN, R. G. 2000. Glycine inhibits growth of T lymphocytes by an IL-2-independent mechanism. *J Immunol*, 164, 176-82.
- STANTON, M. F. 1965. Diethylnitrosamine-Induced Hepatic Degeneration and Neoplasia in the Aquarium Fish, *Brachydanio Rerio*. *J Natl Cancer Inst*, 34, 117-30.
- STREISINGER, G., OKADA, Y., EMRICH, J., NEWTON, J., TSUGITA, A., TERZAGHI, E. & INOUE, M. 1966. Frameshift mutations and the genetic code. This paper is dedicated to Professor Theodosius Dobzhansky on the occasion of his 66th birthday. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 31, 77-84.
- STREISINGER, G., SINGER, F., WALKER, C., KNAUBER, D. & DOWER, N. 1986. Segregation analyses and gene-centromere distances in zebrafish. *Genetics*, 112, 311-9.
- STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. & SINGER, F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291, 293-6.
- SWAMINATHAN, A., HASSAN-ABDI, R., RENAULT, S., SIEKIERSKA, A., RICHE, R., LIAO, M., DE WITTE, P. A. M., YANICOSTAS, C., SOUSSI-YANICOSTAS, N., DRAPEAU, P. & SAMARUT, E. 2018. Non-canonical mTOR-Independent Role of DEPDC5 in Regulating GABAergic Network Development. *Curr Biol*, 28, 1924-1937 e5.
- TAKKE, C., DORNSEIFER, P., WEIZSACKER, E. & CAMPOS-ORTEGA, J. A. 1999. *her4*, a zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *E(spl)*, is a target of NOTCH signalling. *Development*, 126, 1811-21.
- TAVERNA, E., GOTZ, M. & HUTTNER, W. B. 2014. The cell biology of neurogenesis: toward an understanding of the development and evolution of the neocortex. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 465-502.
- TAYLOR, R. C., CULLEN, S. P. & MARTIN, S. J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 231-41.
- THISSE, C. & THISSE, B. 2008. High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nat Protoc*, 3, 59-69.
- TSCHAHARGANEH, D. F., XUE, W., CALVISI, D. F., EVERT, M., MICHURINA, T. V., DOW, L. E., BANITO, A., KATZ, S. F., KASTENHUBER, E. R., WEISSMUELLER, S., HUANG, C. H., LEHEL, A., ANDERSEN, J. B., CAPPER, D., ZENDER, L., LONGERICH, T., ENIKOLOPOV, G. & LOWE, S. W. 2016. p53-Dependent Nestin Regulation Links Tumor Suppression to Cellular Plasticity in Liver Cancer. *Cell*, 165, 1546-1547.
- TSUNEKAWA, Y., BRITTO, J. M., TAKAHASHI, M., POLLEUX, F., TAN, S. S. & OSUMI, N. 2012. Cyclin D2 in the basal process of neural progenitors is linked to non-equivalent cell fates. *EMBO J*, 31, 1879-92.
- UEMURA, T., SHEPHERD, S., ACKERMAN, L., JAN, L. Y. & JAN, Y. N. 1989. *numb*, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in *Drosophila* embryos. *Cell*, 58, 349-60.



- URBAN, N. & GUILLEMOT, F. 2014. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*, 8, 396.
- VARELA-NALLAR, L. & INESTROSA, N. C. 2013. Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci*, 7, 100.
- VESSEY, J. P., AMADEI, G., BURNS, S. E., KIEBLER, M. A., KAPLAN, D. R. & MILLER, F. D. 2012. An asymmetrically localized Staufen2-dependent RNA complex regulates maintenance of mammalian neural stem cells. *Cell Stem Cell*, 11, 517-28.
- VUILLEUMIER, P. H., FRITSCH, R., SCHLIESSBACH, J., SCHMITT, B., ARENDT-NIELSEN, L., ZEILHOFER, H. U. & CURATOLO, M. 2018. Mutations affecting glycinergic neurotransmission in hyperekplexia increase pain sensitivity. *Brain*, 141, 63-71.
- WANG, H., GE, G., UCHIDA, Y., LUU, B. & AHN, S. 2011. Gli3 is required for maintenance and fate specification of cortical progenitors. *J Neurosci*, 31, 6440-8.
- WANG, H., KANE, A. W., LEE, C. & AHN, S. 2014. Gli3 repressor controls cell fates and cell adhesion for proper establishment of neurogenic niche. *Cell Rep*, 8, 1093-104.
- WANG, Y. & SYMES, A. J. 2010. Smad3 deficiency reduces neurogenesis in adult mice. *J Mol Neurosci*, 41, 383-96.
- WARNECKE, G., SCHULZE, B., STEINKAMP, T., HAVERICH, A. & KLIMA, U. 2006. Glycine application and right heart function in a porcine heart transplantation model. *Transpl Int*, 19, 218-24.
- WATANABE, E. & AKAGI, H. 1995. Distribution patterns of mRNAs encoding glycine receptor channels in the developing rat spinal cord. *Neurosci Res*, 23, 377-82.
- WATTS, R. W. & CRAWHALL, J. C. 1959. The first glycine metabolic pool in man. *Biochem J*, 73, 277-86.
- WEINBERG, J. M., DAVIS, J. A., ABARZUA, M. & RAJAN, T. 1987. Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. *J Clin Invest*, 80, 1446-54.
- WELTZIEN, F., PULLER, C., O'SULLIVAN, G. A., PAARMANN, I. & BETZ, H. 2012. Distribution of the glycine receptor beta-subunit in the mouse CNS as revealed by a novel monoclonal antibody. *J Comp Neurol*, 520, 3962-81.
- WEN, W. & ZHANG, M. 2018. Protein Complex Assemblies in Epithelial Cell Polarity and Asymmetric Cell Division. *J Mol Biol*, 430, 3504-3520.
- WERMAN, R., DAVIDOFF, R. A. & APRISON, M. H. 1967. Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine. *Nature*, 214, 681-3.
- WERMAN, R., DAVIDOFF, R. A. & APRISON, M. H. 1968. Inhibitory of glycine on spinal neurons in the cat. *J Neurophysiol*, 31, 81-95.
- WESTERFIELD, M. 1995. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, Institute of Neuro Science.
- WESTERFIELD, M. 2007. *The Zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. Eugene, OR: University of Oregon Press.
- WHITE, R. M., SESSA, A., BURKE, C., BOWMAN, T., LEBLANC, J., CEOL, C., BOURQUE, C., DOVEY, M., GOESSLING, W., BURNS, C. E. & ZON, L. I. 2008. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell*, 2, 183-9.
- WIENHOLDS, E., SCHULTE-MERKER, S., WALDERICH, B. & PLASTERK, R. H. 2002. Target-selected inactivation of the zebrafish rag1 gene. *Science*, 297, 99-102.

- WIESE, C., ROLLETSCHKE, A., KANIA, G., BLYSZCZUK, P., TARASOV, K. V., TARASOVA, Y., WERSTO, R. P., BOHELER, K. R. & WOBUS, A. M. 2004. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci*, 61, 2510-22.
- WILLAREDT, M. A., TASOURI, E. & TUCKER, K. L. 2013. Primary cilia and forebrain development. *Mech Dev*, 130, 373-80.
- WILSCH-BRAUNINGER, M., FLORIO, M. & HUTTNER, W. B. 2016. Neocortex expansion in development and evolution - from cell biology to single genes. *Curr Opin Neurobiol*, 39, 122-32.
- WILSON, P. A. & HEMMATI-BRIVANLOU, A. 1995. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4. *Nature*, 376, 331-3.
- WINKELMANN, A., MAGGIO, N., ELLER, J., CALISKAN, G., SEMTNER, M., HAUSSLER, U., JUTTNER, R., DUGLADZE, T., SMOLINSKY, B., KOWALCZYK, S., CHRONOWSKA, E., SCHWARZ, G., RATHJEN, F. G., REHAVI, G., HAAS, C. A., KULIK, A., GLOVELI, T., HEINEMANN, U. & MEIER, J. C. 2014. Changes in neural network homeostasis trigger neuropsychiatric symptoms. *J Clin Invest*, 124, 696-711.
- WISNIAK, J. 2013. Auguste André omas Cahours. *Educación Química*, Volume 24, Issue 4, October 2013, Pages 451-460
- .
- WON, M., RO, H. & DAWID, I. B. 2015. Lnx2 ubiquitin ligase is essential for exocrine cell differentiation in the early zebrafish pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 12426-31.
- WROBEL, C. N., MUTCH, C. A., SWAMINATHAN, S., TAKETO, M. M. & CHENN, A. 2007. Persistent expression of stabilized beta-catenin delays maturation of radial glial cells into intermediate progenitors. *Dev Biol*, 309, 285-97.
- WU, G. 2010. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv Nutr*, 1, 31-7.
- YIN, F. T., FUTAGAWA, T., LI, D., MA, Y. X., LU, M. H., LU, L., LI, S., CHEN, Y., CAO, Y. J., YANG, Z. Z., OISO, S., NISHIDA, K., KUCHIIWA, S., WATANABE, K., YAMADA, K., TAKEDA, Y., XIAO, Z. C. & MA, Q. H. 2015. Caspr4 interaction with LNX2 modulates the proliferation and neuronal differentiation of mouse neural progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 24, 640-52.
- YOSHIMIZU, T. & CHAKI, S. 2004. Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039. *Biochem Biophys Res Commun*, 315, 493-6.
- YOUNG, T. L. & CEPKO, C. L. 2004. A role for ligand-gated ion channels in rod photoreceptor development. *Neuron*, 41, 867-79.
- ZAFRA, F. & GIMENEZ, C. 2008. Glycine transporters and synaptic function. *IUBMB Life*, 60, 810-7.
- ZHANG, Y., DIXON, C. L., KERAMIDAS, A. & LYNCH, J. W. 2015. Functional reconstitution of glycinergic synapses incorporating defined glycine receptor subunit combinations. *Neuropharmacology*, 89, 391-7.

- ZHANG, Y., IKEJIMA, K., HONDA, H., KITAMURA, T., TAKEI, Y. & SATO, N. 2000. Glycine prevents apoptosis of rat sinusoidal endothelial cells caused by deprivation of vascular endothelial growth factor. *Hepatology*, 32, 542-6.
- ZHONG, W., JIANG, M. M., SCHONEMANN, M. D., MENESES, J. J., PEDERSEN, R. A., JAN, L. Y. & JAN, Y. N. 2000. Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6844-9.
- ZHONG, X., LI, X., QIAN, L., XU, Y., LU, Y., ZHANG, J., LI, N., ZHU, X., BEN, J., YANG, Q. & CHEN, Q. 2012. Glycine attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis in rats. *J Biomed Res*, 26, 346-54.
- ZHONG, Z., WHEELER, M. D., LI, X., FROH, M., SCHEMMER, P., YIN, M., BUNZENDAUL, H., BRADFORD, B. & LEMASTERS, J. J. 2003. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6, 229-40.
- ZININ, N., ADAMEYKO, I., WILHELM, M., FRITZ, N., UHLEN, P., ERNFORS, P. & HENRIKSSON, M. A. 2014. MYC proteins promote neuronal differentiation by controlling the mode of progenitor cell division. *EMBO Rep*, 15, 383-91.

## Annexe

### Chapitre III

Supp. Table 1. **Differentially expressed genes upon GlyR knockdown in zebrafish embryo NSCs.** By filtering with a  $|\log_2FC| > 1$  and a  $p$ -value  $< 0.05$ , we found 1,162 genes differentially expressed upon GlyR knockdown specifically in NSCs. 896 are upregulated (green up arrow) and 266 downregulated (red down arrow). For each gene, the  $\log_2FC$ , the  $p$  value and the base mean values from the DESeq2 analysis are provided. Genes highlighted in blue are those that have been taken back from the overlapping genes also found in control knockdown

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000037804	<i>phlda3</i>	941,61	<b>5,27</b>	1,15E-170
ENSDARG00000095893	<i>si:dkey-85n7.7</i>	257,82	<b>5,05</b>	1,67E-93
ENSDARG00000058325	<i>casp8</i>	1095,90	<b>4,82</b>	1,72E-162
ENSDARG00000096946	<i>si:ch211-92l17.1</i>	137,81	<b>4,76</b>	4,48E-63
ENSDARG00000086374	<i>isg15</i>	190,25	<b>4,73</b>	2,92E-52
ENSDARG00000095252	<i>si:dkey-40h20.1</i>	339,45	<b>4,69</b>	1,74E-105
ENSDARG00000097929	<i>si:dkey-117j14.6</i>	126,34	<b>4,58</b>	2,22E-55
ENSDARG00000011521	<i>upb1</i>	354,07	<b>4,52</b>	5,97E-107
ENSDARG00000043323	<i>lnx1</i>	1444,03	<b>4,51</b>	7,15E-198
ENSDARG00000045636	<i>rbl2</i>	2878,48	<b>4,34</b>	1,32E-44
ENSDARG0000007077	<i>si:dkey-145p14.5</i>	763,94	<b>4,17</b>	6,07E-112
ENSDARG00000018643	<i>igf2a</i>	1793,62	<b>4,10</b>	3,39E-67
ENSDARG00000094584	<i>si:ch211-92l17.1</i>	276,40	<b>4,06</b>	1,40E-78
ENSDARG00000042900	<i>gtpbp1l</i>	836,18	<b>4,03</b>	1,09E-137
ENSDARG00000094508	<i>si:dkey-21o19.8</i>	112,68	<b>4,03</b>	7,66E-47
ENSDARG00000060862	<i>atxn1b</i>	3298,22	<b>3,92</b>	2,60E-165
ENSDARG00000079403	<i>si:dkey-204l11.1</i>	846,39	<b>3,89</b>	6,00E-33
ENSDARG00000063665	<i>mat2al</i>	645,47	<b>3,85</b>	7,63E-35
ENSDARG00000039957	<i>rspo1</i>	457,58	<b>3,79</b>	1,91E-31
ENSDARG00000090186	<i>rps27.2</i>	1864,70	<b>3,77</b>	1,48E-242
ENSDARG00000015822	<i>sesn3</i>	2836,83	<b>3,63</b>	8,88E-40
ENSDARG00000005185	<i>cpn1</i>	90,61	<b>3,61</b>	2,56E-35
ENSDARG00000016771	<i>tfa</i>	82,98	<b>3,55</b>	3,86E-32
ENSDARG00000076554	<i>cdkn1a</i>	2565,54	<b>3,53</b>	9,08E-53
ENSDARG00000017676	<i>mmp2</i>	4591,68	<b>3,49</b>	1,16E-221
ENSDARG00000077327	<i>si:dkey-21o19.6</i>	106,38	<b>3,45</b>	4,86E-37
ENSDARG00000019659	<i>foxi1</i>	253,76	<b>3,39</b>	8,61E-46
ENSDARG00000075718	<i>rpz5</i>	592,30	<b>3,27</b>	5,30E-31
ENSDARG00000092285	<i>cenpv</i>	79,21	<b>3,25</b>	6,54E-28
ENSDARG00000095377	<i>si:ch211-28e16.4</i>	35,88	<b>3,21</b>	1,79E-21
ENSDARG00000052846	<i>fsta</i>	11932,49	<b>3,16</b>	3,11E-142

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000045219	<i>dkk1b</i>	83,44	<b>3,14</b>	5,20E-24
ENSDARG00000090401	<i>CABZ01020840.1</i>	136,17	<b>3,12</b>	5,85E-28
ENSDARG00000043581	<i>gadd45aa</i>	389,35	<b>3,10</b>	2,64E-22
ENSDARG00000074149	<i>ITPR1 (2 of 2)</i>	315,53	<b>3,09</b>	1,02E-20
ENSDARG00000076667	<i>ccng1</i>	48916,30	<b>3,02</b>	1,23E-300
ENSDARG00000007289	<i>METRNL (1 of 2)</i>	140,61	<b>2,97</b>	1,00E-34
ENSDARG00000069282	<i>bbc3</i>	1854,05	<b>2,97</b>	2,47E-94
ENSDARG00000079166	<i>ace</i>	481,43	<b>2,94</b>	8,25E-19
ENSDARG0000006978	<i>zak</i>	226,86	<b>2,91</b>	1,76E-33
ENSDARG00000056656	<i>tspan18a</i>	425,34	<b>2,91</b>	1,43E-48
ENSDARG00000003961	<i>parp3</i>	262,26	<b>2,87</b>	8,96E-40
ENSDARG00000021547	<i>vrk2</i>	253,97	<b>2,85</b>	3,03E-43
ENSDARG00000068613	ENSDARG00000068613	37,94	<b>2,85</b>	2,41E-17
ENSDARG00000033443	<i>mdm2</i>	5281,80	<b>2,83</b>	1,35E-25
ENSDARG00000004034	<i>arhgdig</i>	570,95	<b>2,83</b>	1,30E-58
ENSDARG00000036942	<i>gpd1c</i>	122,69	<b>2,82</b>	7,70E-27
ENSDARG00000056836	<i>si:ch211-125o16.4</i>	301,79	<b>2,80</b>	1,82E-52
ENSDARG00000053592	<i>prdm1b</i>	223,71	<b>2,79</b>	3,48E-17
ENSDARG00000005392	<i>slc5a5</i>	30,61	<b>2,77</b>	5,02E-16
ENSDARG00000090710	<i>RNF14 (4 of 5)</i>	27,98	<b>2,76</b>	1,09E-15
ENSDARG00000005947	<i>slc16a9b</i>	867,21	<b>2,75</b>	7,48E-20
ENSDARG00000097547	<i>si:ch211-8i17.2</i>	29,24	<b>2,73</b>	1,63E-15
ENSDARG00000096603	<i>bmb</i>	1154,28	<b>2,72</b>	7,13E-62
ENSDARG00000022670	<i>he2</i>	56,98	<b>2,71</b>	2,63E-16
ENSDARG00000060246	<i>slc16a6b</i>	103,94	<b>2,71</b>	2,75E-19
ENSDARG00000044010	<i>lox12a</i>	226,51	<b>2,67</b>	7,29E-31
ENSDARG00000042874	<i>phlda2</i>	469,96	<b>2,65</b>	3,99E-48
ENSDARG00000069630	<i>tat</i>	133,43	<b>2,63</b>	7,16E-27
ENSDARG00000096310	<i>TAF1C</i>	1165,38	<b>2,61</b>	2,76E-72
ENSDARG00000007358	<i>cxcr3.1</i>	27,45	<b>2,61</b>	4,84E-14
ENSDARG00000077426	<i>zbtb38</i>	38,13	<b>2,58</b>	1,03E-14
ENSDARG00000059544	<i>pappaa</i>	55,91	<b>2,57</b>	1,72E-16
ENSDARG00000087093	<i>si:ch211-157c3.4</i>	225,59	<b>2,57</b>	5,24E-32
ENSDARG00000042727	<i>EXO5</i>	1165,07	<b>2,55</b>	2,00E-61
ENSDARG00000074087	<i>NIM1K</i>	102,16	<b>2,54</b>	3,23E-19
ENSDARG00000035559	<i>tp53</i>	16057,59	<b>2,54</b>	1,34E-171
ENSDARG00000041430	<i>bmp2b</i>	132,02	<b>2,54</b>	2,67E-19
ENSDARG00000026281	<i>lyrm1</i>	352,72	<b>2,50</b>	4,53E-44
ENSDARG00000028173	<i>slc4a2a</i>	914,88	<b>2,48</b>	3,56E-17
ENSDARG00000037421	<i>egr1</i>	1507,62	<b>2,46</b>	4,19E-65
ENSDARG00000088290	<i>foxj1b</i>	278,62	<b>2,45</b>	5,86E-31
ENSDARG00000094300	<i>si:ch211-160e1.5</i>	2564,21	<b>2,45</b>	6,76E-103
ENSDARG00000003216	<i>anxa2a</i>	195,81	<b>2,45</b>	1,00E-30
ENSDARG00000034707	<i>TRIM47 (15 of 90)</i>	26,42	<b>2,43</b>	2,51E-12
ENSDARG00000078683	<i>RNF14 (3 of 5)</i>	498,50	<b>2,43</b>	1,26E-12
ENSDARG00000093910	<i>FP015791.1</i>	19,85	<b>2,43</b>	2,12E-12
ENSDARG00000034836	<i>KRT80</i>	137,53	<b>2,42</b>	1,99E-24
ENSDARG00000089697	<i>nfe2l2b</i>	92,66	<b>2,41</b>	3,57E-16

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000055527	<i>cmn</i>	3414,18	<b>2,41</b>	2,15E-64
ENSDARG00000012968	<i>rhoub</i>	3031,09	<b>2,39</b>	1,23E-91
ENSDARG00000040161	ENSDARG00000040161	60,00	<b>2,37</b>	3,94E-15
ENSDARG00000031600	<i>rd3</i>	489,26	<b>2,37</b>	5,94E-14
ENSDARG00000059002	<i>evplb</i>	407,98	<b>2,37</b>	4,15E-46
ENSDARG00000053010	<i>lpcat2</i>	352,82	<b>2,36</b>	2,27E-40
ENSDARG00000060682	<i>zgc:165571</i>	173,05	<b>2,35</b>	1,12E-25
ENSDARG00000088655	<i>CABZ01007794.1</i>	258,51	<b>2,34</b>	4,52E-35
ENSDARG00000043701	<i>gpd1a</i>	100,49	<b>2,33</b>	1,47E-18
ENSDARG00000039066	<i>klhl31</i>	438,57	<b>2,32</b>	3,37E-37
ENSDARG00000017624	<i>krt4</i>	23723,80	<b>2,30</b>	8,98E-99
ENSDARG00000026726	<i>anxa1a</i>	266,65	<b>2,30</b>	1,16E-33
ENSDARG00000093639	<i>si:dkey-90a24.1</i>	27,40	<b>2,28</b>	4,79E-11
ENSDARG00000091108	<i>xirp2c</i>	276,98	<b>2,27</b>	7,99E-35
ENSDARG00000011168	<i>anxa1c</i>	712,60	<b>2,27</b>	1,83E-48
ENSDARG00000021200	<i>nebl</i>	65,26	<b>2,26</b>	4,98E-14
ENSDARG00000058513	<i>gfra1a</i>	87,11	<b>2,25</b>	9,15E-15
ENSDARG00000071219	<i>pik3r3a</i>	2802,28	<b>2,24</b>	5,60E-73
ENSDARG00000025403	<i>ftr83</i>	242,74	<b>2,24</b>	4,37E-31
ENSDARG00000069335	<i>BCL6B</i>	84,05	<b>2,23</b>	1,01E-14
ENSDARG00000023886	<i>cacna2d4b</i>	65,98	<b>2,22</b>	1,43E-13
ENSDARG00000014246	<i>JAG2 (1 of 2)</i>	40,44	<b>2,22</b>	5,52E-11
ENSDARG00000058371	<i>krt5</i>	3931,88	<b>2,21</b>	1,55E-124
ENSDARG00000008329	<i>asic1a</i>	991,43	<b>2,21</b>	2,34E-13
ENSDARG00000035556	<i>rps6ka3a</i>	664,18	<b>2,20</b>	3,32E-40
ENSDARG00000015293	<i>fam110a</i>	73,58	<b>2,17</b>	1,83E-12
ENSDARG00000042825	<i>rnf169</i>	2198,89	<b>2,17</b>	9,13E-48
ENSDARG00000069654	<i>ppp6r2b</i>	442,07	<b>2,16</b>	1,77E-26
ENSDARG00000036965	<i>rnf24</i>	738,42	<b>2,15</b>	8,36E-57
ENSDARG00000089441	<i>si:ch211-105c13.3</i>	46,81	<b>2,14</b>	4,50E-11
ENSDARG00000077207	<i>lzts2b</i>	94,05	<b>2,14</b>	9,59E-14
ENSDARG00000092875	<i>si:dkey-264b2.3</i>	50,67	<b>2,13</b>	2,33E-10
ENSDARG00000088885	<i>si:ch1073-340i21.3</i>	151,50	<b>2,12</b>	5,93E-20
ENSDARG00000076044	<i>TRHDE (2 of 2)</i>	38,59	<b>2,12</b>	1,71E-10
ENSDARG00000088002	<i>BX322608.1</i>	324,13	<b>2,12</b>	1,09E-27
ENSDARG00000089390	<i>CABZ01068602.1</i>	104,73	<b>2,11</b>	1,16E-14
ENSDARG00000068761	<i>mespab</i>	51,22	<b>2,09</b>	4,59E-11
ENSDARG00000091492	<i>LOXL2 (3 of 3)</i>	90,08	<b>2,08</b>	9,09E-14
ENSDARG00000038151	<i>zgc:92360</i>	203,18	<b>2,07</b>	1,26E-24
ENSDARG00000077377	<i>PRIMA1</i>	142,77	<b>2,06</b>	1,60E-16
ENSDARG00000023082	<i>krt1-19d</i>	47,04	<b>2,06</b>	3,68E-10
ENSDARG00000037898	<i>ppl</i>	572,61	<b>2,06</b>	1,04E-43
ENSDARG00000028096	<i>CLDN23 (1 of 2)</i>	91,46	<b>2,06</b>	8,07E-14
ENSDARG00000021184	<i>rbfox1l</i>	179,95	<b>2,05</b>	3,85E-20
ENSDARG00000091600	<i>CR352229.1</i>	346,93	<b>2,05</b>	4,56E-28
ENSDARG00000058206	<i>sb:cb252</i>	120,37	<b>2,04</b>	3,87E-16
ENSDARG00000071150	<i>cica</i>	621,19	<b>2,04</b>	1,23E-10
ENSDARG00000023797	<i>ryr1b</i>	171,65	<b>2,04</b>	8,85E-20

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000077726	<i>ccrn4la</i>	291,97	<b>2,03</b>	2,63E-26
ENSDARG00000030110	<i>myod1</i>	89,93	<b>2,02</b>	3,10E-13
ENSDARG00000079839	<i>arrdc1b</i>	384,16	<b>2,01</b>	1,42E-22
ENSDARG00000026871	<i>uchl1</i>	194,00	<b>2,01</b>	1,31E-17
ENSDARG00000088277	<i>susd5</i>	49,46	<b>1,99</b>	3,41E-10
ENSDARG00000069481	<i>ghrh</i>	19,20	<b>1,98</b>	2,01E-08
ENSDARG00000093549	<i>sepp1a</i>	168,05	<b>1,98</b>	6,87E-18
ENSDARG00000017953	<i>tp73</i>	124,37	<b>1,98</b>	2,01E-11
ENSDARG00000011785	<i>tbx6</i>	532,43	<b>1,98</b>	1,81E-29
ENSDARG00000062222	<i>mxra8a</i>	35,06	<b>1,98</b>	5,55E-09
ENSDARG00000073711	<i>mmrn2b</i>	510,51	<b>1,98</b>	1,57E-08
ENSDARG00000054451	<i>loxl1</i>	163,12	<b>1,97</b>	4,01E-16
ENSDARG00000079783	<i>isg20</i>	3381,35	<b>1,97</b>	9,27E-104
ENSDARG00000033824	<i>rnf213b</i>	86,11	<b>1,96</b>	4,43E-11
ENSDARG00000090369	<i>zgc:86896</i>	346,32	<b>1,96</b>	1,24E-25
ENSDARG00000062058	<i>slc12a7b</i>	385,94	<b>1,96</b>	7,20E-09
ENSDARG00000036848	<i>slc43a2a</i>	568,06	<b>1,96</b>	2,01E-09
ENSDARG00000069265	<i>matn3b</i>	33,23	<b>1,96</b>	1,22E-08
ENSDARG00000036572	<i>dusp2</i>	86,23	<b>1,95</b>	1,93E-12
ENSDARG00000036670	<i>aplrb</i>	229,28	<b>1,95</b>	2,49E-23
ENSDARG00000035891	<i>acana</i>	24,83	<b>1,95</b>	3,86E-08
ENSDARG00000058458	<i>cyp2k16</i>	29,39	<b>1,94</b>	3,07E-08
ENSDARG00000018820	<i>flncb</i>	1275,50	<b>1,94</b>	2,52E-37
ENSDARG00000024047	<i>tmem38a</i>	158,27	<b>1,94</b>	1,60E-16
ENSDARG00000054562	<i>her15.1</i>	5500,29	<b>1,94</b>	1,33E-64
ENSDARG00000092362	<i>hsp70.2</i>	151,86	<b>1,94</b>	1,49E-13
ENSDARG00000078994	<i>si:ch211-198o8.4</i>	17,60	<b>1,93</b>	4,00E-08
ENSDARG00000091253	<i>CU469500.4</i>	106,57	<b>1,93</b>	1,10E-13
ENSDARG00000055642	<i>si:ch211-217a12.1</i>	14,23	<b>1,92</b>	1,88E-08
ENSDARG00000036009	<i>NANS (1 of 2)</i>	53,19	<b>1,92</b>	1,02E-09
ENSDARG00000019808	<i>evpla</i>	298,70	<b>1,92</b>	2,69E-26
ENSDARG00000056732	<i>her4.1</i>	512,30	<b>1,91</b>	1,18E-29
ENSDARG00000042904	<i>foxa3b</i>	3892,69	<b>1,90</b>	6,15E-15
ENSDARG00000068910	<i>nos1</i>	149,69	<b>1,90</b>	9,45E-17
ENSDARG00000078195	<i>fhit</i>	79,07	<b>1,90</b>	4,24E-11
ENSDARG00000057173	<i>zgc:123282</i>	13,88	<b>1,89</b>	3,35E-08
ENSDARG00000036967	<i>smox</i>	250,75	<b>1,89</b>	1,34E-19
ENSDARG00000058549	<i>smyd1b</i>	167,13	<b>1,88</b>	5,00E-15
ENSDARG00000003963	<i>traf4a</i>	2087,05	<b>1,86</b>	9,12E-70
ENSDARG00000062970	<i>fam129ba</i>	291,54	<b>1,86</b>	1,52E-25
ENSDARG00000068191	<i>cdh15</i>	148,01	<b>1,86</b>	7,79E-14
ENSDARG00000071345	<i>mgst2</i>	222,62	<b>1,85</b>	3,84E-20
ENSDARG00000093458	<i>si:dkey-76d14.2</i>	38,91	<b>1,85</b>	4,61E-08
ENSDARG00000041505	<i>itm2bb</i>	301,24	<b>1,85</b>	1,66E-18
ENSDARG00000039499	<i>soul2</i>	50,15	<b>1,85</b>	6,61E-09
ENSDARG00000096887	<i>si:ch211-220p4.1</i>	583,04	<b>1,84</b>	9,79E-31
ENSDARG00000075954	<i>serpinh1a</i>	3247,44	<b>1,84</b>	7,04E-12
ENSDARG00000017389	<i>igfbp7</i>	156,38	<b>1,84</b>	3,98E-14

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000053158	<i>PRSS56</i>	86,33	<b>1,82</b>	1,50E-10
ENSDARG00000078738	<i>NAMPT (3 of 6)</i>	12,34	<b>1,82</b>	1,11E-07
ENSDARG00000067652	<i>im:7150988</i>	219,36	<b>1,82</b>	1,68E-18
ENSDARG00000055683	<i>si:ch211-198e20.11</i>	78,16	<b>1,81</b>	5,24E-11
ENSDARG00000014277	<i>vox</i>	91,95	<b>1,80</b>	6,86E-11
ENSDARG00000038232	<i>zgc:112964</i>	22,13	<b>1,80</b>	4,18E-07
ENSDARG00000058656	<i>desma</i>	581,81	<b>1,80</b>	1,04E-24
ENSDARG00000074156	<i>sgca</i>	143,29	<b>1,80</b>	4,03E-15
ENSDARG00000009905	<i>ntla</i>	327,42	<b>1,80</b>	1,61E-16
ENSDARG00000054560	<i>ZGC:136520</i>	3548,50	<b>1,80</b>	1,07E-45
ENSDARG00000020978	<i>dhrs13a.2</i>	63,97	<b>1,78</b>	6,14E-09
ENSDARG00000070427	<i>s100v1</i>	76,19	<b>1,78</b>	8,89E-10
ENSDARG00000079071	<i>jam2b</i>	72,13	<b>1,77</b>	5,34E-09
ENSDARG00000036541	<i>rhbdf1</i>	707,06	<b>1,77</b>	2,85E-10
ENSDARG00000043235	<i>sox4b</i>	588,86	<b>1,77</b>	1,87E-32
ENSDARG00000039052	<i>klhl40a</i>	97,62	<b>1,77</b>	1,95E-10
ENSDARG00000007377	<i>odc1</i>	6914,41	<b>1,77</b>	2,81E-61
ENSDARG00000091128	<i>BX005006.2</i>	47,50	<b>1,77</b>	5,15E-08
ENSDARG00000017799	<i>tgm1</i>	29,00	<b>1,77</b>	4,11E-07
ENSDARG00000005541	<i>wif1</i>	579,94	<b>1,77</b>	1,83E-34
ENSDARG00000089490	<i>kcnq4</i>	11,44	<b>1,76</b>	2,30E-07
ENSDARG00000043442	<i>MAL (2 of 3)</i>	71,04	<b>1,76</b>	3,33E-09
ENSDARG00000051861	<i>pkp3a</i>	278,16	<b>1,75</b>	5,61E-19
ENSDARG00000057317	<i>nexn</i>	255,81	<b>1,75</b>	1,34E-16
ENSDARG00000030905	<i>cited2</i>	543,26	<b>1,75</b>	2,20E-28
ENSDARG00000018773	<i>HIVEP2 (1 of 2)</i>	24,44	<b>1,75</b>	1,08E-06
ENSDARG00000025254	<i>s100a10b</i>	220,63	<b>1,74</b>	1,66E-15
ENSDARG00000044094	<i>gfpt2</i>	47,77	<b>1,74</b>	7,97E-08
ENSDARG00000008433	<i>unc45b</i>	933,96	<b>1,74</b>	1,47E-25
ENSDARG00000014594	<i>anxa1b</i>	194,02	<b>1,74</b>	1,47E-16
ENSDARG00000007277	<i>myf5</i>	171,61	<b>1,73</b>	7,13E-15
ENSDARG00000079564	<i>vmhc</i>	41,29	<b>1,73</b>	8,18E-07
ENSDARG00000090752	<i>plk2a</i>	97,16	<b>1,73</b>	8,65E-10
ENSDARG00000087343	<i>hs3st1l1</i>	20,04	<b>1,72</b>	1,63E-06
ENSDARG00000015611	<i>rasl11b</i>	1353,47	<b>1,72</b>	1,34E-38
ENSDARG00000005785	<i>elovl7b</i>	123,14	<b>1,72</b>	9,91E-12
ENSDARG00000074390	<i>tmem176l.4</i>	66,17	<b>1,72</b>	7,52E-09
ENSDARG00000090014	<i>CAPN2 (3 of 4)</i>	117,59	<b>1,72</b>	4,73E-11
ENSDARG00000038639	<i>elovl6l</i>	53,95	<b>1,71</b>	3,76E-08
ENSDARG00000029764	<i>mef2ca</i>	352,97	<b>1,71</b>	1,34E-20
ENSDARG00000009438	<i>myog</i>	97,92	<b>1,71</b>	2,27E-09
ENSDARG00000077219	<i>PLXDC2 (2 of 2)</i>	36,25	<b>1,71</b>	6,24E-07
ENSDARG00000026403	<i>HEPHL1 (1 of 3)</i>	27,31	<b>1,70</b>	1,48E-06
ENSDARG00000017078	<i>mespaa</i>	67,32	<b>1,69</b>	1,03E-08
ENSDARG00000002947	<i>abcd3b</i>	40,63	<b>1,69</b>	3,01E-07
ENSDARG00000076241	<i>txlnbb</i>	112,33	<b>1,69</b>	7,37E-11
ENSDARG00000016470	<i>anxa5b</i>	166,91	<b>1,69</b>	9,07E-15
ENSDARG00000090585	<i>gpc1b</i>	63,70	<b>1,69</b>	2,48E-08



Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000057726	<i>znf185</i>	233,59	<b>1,68</b>	1,24E-17
ENSDARG00000017441	<i>mylz3</i>	247,84	<b>1,68</b>	7,43E-16
ENSDARG00000074002	<i>slc6a11a</i>	102,05	<b>1,68</b>	1,40E-10
ENSDARG00000021924	<i>hsp70.3</i>	559,67	<b>1,68</b>	1,23E-07
ENSDARG00000070804	<i>arhgap17b</i>	81,08	<b>1,68</b>	6,58E-09
ENSDARG00000039843	<i>znf800b</i>	184,48	<b>1,68</b>	9,90E-15
ENSDARG00000055592	<i>capn2b</i>	107,94	<b>1,67</b>	6,43E-11
ENSDARG00000093440	<i>tnfaip6</i>	85,32	<b>1,67</b>	3,40E-08
ENSDARG00000036028	<i>arrdc3b</i>	521,75	<b>1,67</b>	2,22E-24
ENSDARG00000008772	<i>cacng1</i>	64,09	<b>1,67</b>	3,08E-08
ENSDARG00000077775	<i>zgc:193681</i>	27,16	<b>1,67</b>	2,98E-06
ENSDARG00000034211	<i>capn2l</i>	88,09	<b>1,66</b>	3,79E-09
ENSDARG00000040923	<i>crabp2a</i>	3026,91	<b>1,66</b>	1,56E-37
ENSDARG00000040569	<i>tgm1l4</i>	99,64	<b>1,65</b>	1,44E-10
ENSDARG00000020594	<i>txlnba</i>	275,55	<b>1,65</b>	1,10E-15
ENSDARG00000007682	<i>ppdpfa</i>	175,98	<b>1,65</b>	7,85E-14
ENSDARG00000010478	<i>hsp90aa1.1</i>	1905,90	<b>1,64</b>	8,34E-08
ENSDARG00000068710	<i>nid1a</i>	136,00	<b>1,63</b>	5,72E-11
ENSDARG00000018306	<i>srl</i>	327,14	<b>1,63</b>	6,92E-15
ENSDARG00000029356	<i>mboat1</i>	111,26	<b>1,63</b>	9,76E-11
ENSDARG00000032242	<i>tnnt2c</i>	536,10	<b>1,62</b>	3,93E-18
ENSDARG00000074686	<i>mgea5</i>	3081,34	<b>1,62</b>	3,35E-36
ENSDARG00000020693	<i>sesn1</i>	1182,59	<b>1,61</b>	5,40E-31
ENSDARG00000090586	<i>SP6</i>	18,11	<b>1,61</b>	8,38E-06
ENSDARG00000000102	<i>musk</i>	34,76	<b>1,60</b>	4,07E-06
ENSDARG00000014106	<i>cf12</i>	141,35	<b>1,60</b>	1,27E-12
ENSDARG00000036371	<i>acta1a</i>	1138,22	<b>1,60</b>	2,28E-23
ENSDARG00000013926	<i>slc16a9a</i>	51,16	<b>1,59</b>	9,81E-07
ENSDARG00000027529	<i>hmox1a</i>	104,03	<b>1,59</b>	1,43E-08
ENSDARG00000000002	<i>ccdc80</i>	60,60	<b>1,59</b>	5,65E-07
ENSDARG00000062271	<i>slc25a15b</i>	97,29	<b>1,58</b>	1,92E-09
ENSDARG00000012738	<i>zcchc14</i>	133,78	<b>1,58</b>	9,58E-11
ENSDARG00000097973	<i>si:ch1073-190k2.1</i>	58,86	<b>1,58</b>	4,27E-07
ENSDARG00000039577	<i>ptk2bb</i>	154,63	<b>1,57</b>	3,32E-11
ENSDARG00000091699	<i>capn2a</i>	393,64	<b>1,57</b>	1,03E-17
ENSDARG00000069706	<i>prmt6</i>	314,72	<b>1,57</b>	5,92E-21
ENSDARG00000096905	<i>si:ch73-23l24.1</i>	299,36	<b>1,57</b>	9,01E-06
ENSDARG00000078254	<i>ftr14l</i>	29,92	<b>1,56</b>	8,65E-06
ENSDARG00000023062	<i>cyr61</i>	2100,27	<b>1,56</b>	1,33E-37
ENSDARG00000069279	<i>elovl7a</i>	51,94	<b>1,56</b>	7,09E-07
ENSDARG00000053878	<i>zgc:123248</i>	341,28	<b>1,55</b>	6,96E-20
ENSDARG00000093494	<i>si:ch211-217k17.9</i>	53,74	<b>1,55</b>	1,09E-06
ENSDARG00000075463	<i>mss51</i>	114,51	<b>1,55</b>	1,80E-08
ENSDARG00000071547	<i>CABZ01047562.1</i>	1517,15	<b>1,55</b>	7,16E-29
ENSDARG00000076330	<i>dusp12</i>	59,10	<b>1,55</b>	3,63E-07
ENSDARG00000091548	<i>stard9</i>	426,80	<b>1,55</b>	1,36E-20
ENSDARG00000097902	<i>si:ch73-204p21.2</i>	35,73	<b>1,55</b>	6,12E-06
ENSDARG00000029290	<i>stx11b.1</i>	38,17	<b>1,54</b>	5,24E-06

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000058984	<i>rad23ab</i>	298,40	<b>1,54</b>	1,08E-15
ENSDARG00000088337	<i>wu:fc34e06</i>	54,98	<b>1,54</b>	6,57E-07
ENSDARG00000017917	<i>her7</i>	53,79	<b>1,54</b>	1,43E-06
ENSDARG00000037403	<i>HSPA8 (1 of 2)</i>	139,86	<b>1,54</b>	1,06E-07
ENSDARG00000042557	<i>rnf144ab</i>	314,21	<b>1,53</b>	2,78E-16
ENSDARG00000041982	<i>adamts6</i>	167,12	<b>1,53</b>	1,07E-11
ENSDARG00000056530	<i>CPAMD8</i>	936,02	<b>1,53</b>	5,27E-22
ENSDARG00000075263	<i>ankrd1a</i>	21,36	<b>1,53</b>	2,31E-05
ENSDARG00000056175	<i>scrt2</i>	1981,68	<b>1,53</b>	1,97E-39
ENSDARG00000060315	<i>si:dkey-193b15.6</i>	15,34	<b>1,53</b>	2,01E-05
ENSDARG00000087152	<i>SOWAHD</i>	102,44	<b>1,53</b>	1,35E-08
ENSDARG00000003081	<i>mybphb</i>	325,63	<b>1,52</b>	7,41E-13
ENSDARG00000003091	<i>oclnb</i>	75,66	<b>1,52</b>	1,29E-07
ENSDARG00000037943	<i>zgc:112484</i>	243,14	<b>1,52</b>	1,91E-14
ENSDARG00000017128	<i>MYOF</i>	119,76	<b>1,52</b>	5,70E-10
ENSDARG00000088711	<i>lgals11</i>	124,84	<b>1,52</b>	3,42E-09
ENSDARG00000089513	<i>si:ch211-119d14.4</i>	31,60	<b>1,52</b>	1,51E-05
ENSDARG00000014058	<i>rab36</i>	124,85	<b>1,51</b>	7,41E-10
ENSDARG00000004196	<i>tnfsf10l</i>	376,57	<b>1,51</b>	6,83E-18
ENSDARG00000013576	<i>gadd45bb</i>	395,07	<b>1,51</b>	7,48E-20
ENSDARG00000073955	<i>PNPLA2</i>	19,16	<b>1,51</b>	3,25E-05
ENSDARG00000041947	<i>styk1</i>	53,93	<b>1,51</b>	1,34E-06
ENSDARG00000074638	<i>loxhd1b</i>	20,46	<b>1,51</b>	3,44E-05
ENSDARG00000042934	<i>ctgfa</i>	2197,70	<b>1,51</b>	7,27E-39
ENSDARG00000062788	<i>irg1l</i>	100,79	<b>1,50</b>	6,59E-07
ENSDARG00000053091	<i>BDP1 (1 of 2)</i>	350,86	<b>1,50</b>	4,51E-19
ENSDARG00000067742	<i>eva1bb</i>	71,77	<b>1,50</b>	2,55E-07
ENSDARG00000097160	<i>si:ch211-121j5.4</i>	26,23	<b>1,50</b>	2,94E-05
ENSDARG00000009822	<i>her4.4</i>	1502,87	<b>1,50</b>	1,70E-24
ENSDARG00000077799	<i>EGR4 (1 of 2)</i>	252,47	<b>1,50</b>	8,97E-16
ENSDARG00000055094	<i>CAPN12 (2 of 2)</i>	54,50	<b>1,50</b>	1,92E-06
ENSDARG00000074160	<i>PAQR4 (1 of 2)</i>	26,14	<b>1,50</b>	2,98E-05
ENSDARG00000078619	<i>pnp5a</i>	404,02	<b>1,49</b>	1,48E-21
ENSDARG00000035958	<i>tnni2b.1</i>	571,58	<b>1,49</b>	3,72E-07
ENSDARG00000094426	<i>her4.2</i>	1796,40	<b>1,49</b>	1,65E-22
ENSDARG00000030176	<i>ITGB1BP2</i>	174,81	<b>1,49</b>	1,02E-10
ENSDARG00000055647	<i>ftr82</i>	568,86	<b>1,49</b>	4,31E-23
ENSDARG00000009021	<i>chrna1</i>	91,17	<b>1,49</b>	2,07E-07
ENSDARG00000078222	<i>aatka</i>	212,05	<b>1,48</b>	1,02E-09
ENSDARG00000020574	<i>atp2a1</i>	1954,77	<b>1,48</b>	5,51E-07
ENSDARG00000062370	<i>bcl2l13</i>	367,16	<b>1,48</b>	6,11E-20
ENSDARG00000078299	<i>COLGALT2 (2 of 2)</i>	16,73	<b>1,48</b>	4,97E-05
ENSDARG00000086647	<i>chrng</i>	76,49	<b>1,48</b>	3,77E-07
ENSDARG00000001950	<i>ak1</i>	91,66	<b>1,48</b>	2,67E-07
ENSDARG00000029018	<i>cdkn1ba</i>	783,41	<b>1,47</b>	7,35E-23
ENSDARG00000019342	<i>chrnd</i>	51,41	<b>1,47</b>	5,98E-06
ENSDARG00000042535	<i>actc1a</i>	1100,68	<b>1,47</b>	3,14E-08
ENSDARG00000068231	<i>CABZ01062083.1</i>	27,41	<b>1,47</b>	4,86E-05

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000055784	<i>ptpn3</i>	66,14	<b>1,47</b>	1,89E-06
ENSDARG00000091669	<i>si:dkey-17e16.17</i>	46,14	<b>1,47</b>	6,68E-06
ENSDARG00000052690	<i>arrdc3a</i>	841,47	<b>1,46</b>	8,56E-27
ENSDARG00000038867	<i>shhb</i>	319,49	<b>1,46</b>	3,77E-16
ENSDARG00000011672	<i>SEMA3B</i>	337,28	<b>1,46</b>	3,34E-17
ENSDARG00000038612	<i>pih1d3</i>	41,93	<b>1,46</b>	2,08E-05
ENSDARG00000006757	<i>klhl41b</i>	434,77	<b>1,46</b>	4,51E-06
ENSDARG00000045262	<i>gsnb</i>	381,72	<b>1,46</b>	9,43E-19
ENSDARG00000068947	<i>si:ch211-264e16.1</i>	23,71	<b>1,46</b>	6,04E-05
ENSDARG00000079122	<i>tmx2a</i>	35,05	<b>1,45</b>	2,79E-05
ENSDARG00000038559	<i>h1f0</i>	3455,66	<b>1,45</b>	4,63E-09
ENSDARG00000040046	<i>snai2</i>	301,09	<b>1,45</b>	5,80E-14
ENSDARG00000041051	<i>mid1ip1a</i>	141,86	<b>1,45</b>	2,97E-09
ENSDARG00000070835	<i>tnnc2</i>	545,02	<b>1,45</b>	6,12E-06
ENSDARG00000003684	<i>obsl1a</i>	104,98	<b>1,44</b>	1,66E-07
ENSDARG00000061948	<i>amotl2b</i>	820,59	<b>1,44</b>	8,52E-27
ENSDARG00000058966	<i>zgc:112332</i>	289,46	<b>1,44</b>	3,18E-12
ENSDARG00000026001	<i>tmem8c</i>	31,38	<b>1,43</b>	4,44E-05
ENSDARG00000045808	<i>rlbp1b</i>	40,10	<b>1,43</b>	2,44E-05
ENSDARG00000032238	<i>dnm3</i>	28,50	<b>1,43</b>	7,87E-05
ENSDARG00000058357	<i>ankrd33ba</i>	22,16	<b>1,43</b>	8,81E-05
ENSDARG00000019125	<i>klhl40b</i>	47,68	<b>1,43</b>	3,34E-05
ENSDARG00000003900	<i>si:dkeyp-111e5.4</i>	98,47	<b>1,43</b>	1,76E-07
ENSDARG00000054058	<i>h1fx</i>	669,31	<b>1,43</b>	2,14E-06
ENSDARG00000016357	<i>fmo5</i>	455,57	<b>1,43</b>	6,06E-21
ENSDARG00000019920	<i>lft1</i>	18,93	<b>1,42</b>	9,51E-05
ENSDARG00000092934	<i>si:dkey-32e6.3</i>	38,73	<b>1,42</b>	2,27E-05
ENSDARG00000062750	<i>si:ch73-74h11.1</i>	24,87	<b>1,42</b>	8,13E-05
ENSDARG00000058734	<i>prdx1</i>	502,90	<b>1,42</b>	3,50E-21
ENSDARG00000063009	<i>CATIP</i>	81,25	<b>1,42</b>	1,65E-06
ENSDARG00000069361	<i>spa17</i>	100,53	<b>1,42</b>	2,11E-07
ENSDARG00000075020	<i>ppapdc3</i>	84,40	<b>1,42</b>	7,75E-07
ENSDARG00000038754	<i>plk3</i>	1363,12	<b>1,42</b>	2,86E-31
ENSDARG00000074533	<i>slc25a38b</i>	156,54	<b>1,42</b>	2,44E-10
ENSDARG00000036291	<i>nucb2b</i>	158,03	<b>1,41</b>	1,49E-10
ENSDARG00000042182	<i>drc1</i>	141,61	<b>1,41</b>	3,41E-08
ENSDARG00000006202	<i>erbb3a</i>	55,91	<b>1,41</b>	5,78E-06
ENSDARG00000036894	<i>AIMP1 (1 of 2)</i>	57,97	<b>1,41</b>	1,28E-05
ENSDARG00000018296	<i>rev1</i>	1348,72	<b>1,41</b>	2,13E-19
ENSDARG00000040712	<i>adprh</i>	181,88	<b>1,41</b>	2,98E-10
ENSDARG00000034470	<i>aldoab</i>	270,27	<b>1,41</b>	2,90E-05
ENSDARG00000061977	<i>ppfibp2a</i>	85,72	<b>1,40</b>	2,40E-06
ENSDARG00000058939	<i>b4galnt3b</i>	143,29	<b>1,40</b>	6,29E-10
ENSDARG00000088260	<i>gig2p</i>	11,79	<b>1,40</b>	4,58E-05
ENSDARG00000001169	<i>hsd17b8</i>	22,78	<b>1,40</b>	0,000122752
ENSDARG00000094695	<i>si:dkey-204f11.64</i>	114,74	<b>1,40</b>	1,35E-08
ENSDARG00000091746	<i>si:dkey-16p6.1</i>	24,90	<b>1,40</b>	0,000104473
ENSDARG00000021318	<i>capgb</i>	33,80	<b>1,40</b>	7,15E-05

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000020224	<i>ERGIC2 (1 of 2)</i>	10,47	<b>1,40</b>	5,65E-05
ENSDARG00000055723	<i>hsp70l</i>	136,04	<b>1,40</b>	1,02E-08
ENSDARG00000058820	<i>bin1</i>	58,43	<b>1,40</b>	1,04E-05
ENSDARG00000002060	<i>brf2</i>	245,33	<b>1,40</b>	3,85E-10
ENSDARG00000019128	<i>tpm4b</i>	400,51	<b>1,40</b>	9,28E-16
ENSDARG00000033683	<i>tpma</i>	703,38	<b>1,40</b>	5,09E-06
ENSDARG00000043497	<i>scrm2</i>	83,58	<b>1,39</b>	1,31E-05
ENSDARG00000017665	<i>snrkb</i>	161,19	<b>1,39</b>	2,59E-08
ENSDARG00000043133	<i>cldnf</i>	31,17	<b>1,39</b>	0,000110662
ENSDARG00000092170	<i>apoc1l</i>	1099,73	<b>1,39</b>	3,05E-17
ENSDARG00000042544	<i>degs2</i>	28,72	<b>1,39</b>	0,000109567
ENSDARG00000071014	<i>s100u</i>	214,27	<b>1,39</b>	4,98E-12
ENSDARG00000056729	<i>her4.2</i>	733,53	<b>1,39</b>	5,34E-21
ENSDARG00000005629	<i>smyd2b</i>	143,20	<b>1,38</b>	9,64E-08
ENSDARG00000067976	<i>ar</i>	68,67	<b>1,38</b>	2,11E-06
ENSDARG00000055514	<i>icn2</i>	100,74	<b>1,38</b>	8,98E-07
ENSDARG00000086874	<i>si:ch211-232i5.3</i>	17,75	<b>1,38</b>	0,000167648
ENSDARG00000044167	<i>padi2</i>	426,63	<b>1,38</b>	7,41E-13
ENSDARG00000034677	<i>scel</i>	223,54	<b>1,38</b>	1,35E-12
ENSDARG00000012824	<i>itga3b</i>	451,97	<b>1,38</b>	5,92E-19
ENSDARG00000014386	<i>galnt6</i>	332,79	<b>1,38</b>	1,46E-15
ENSDARG00000010782	<i>zgc:55621</i>	26,87	<b>1,38</b>	0,000132042
ENSDARG00000058865	<i>endog</i>	210,67	<b>1,37</b>	7,39E-12
ENSDARG00000077410	<i>myo9b</i>	132,34	<b>1,37</b>	6,50E-09
ENSDARG00000039943	<i>fam46ba</i>	538,53	<b>1,37</b>	5,00E-13
ENSDARG00000071116	<i>eepd1</i>	27,62	<b>1,37</b>	0,000125716
ENSDARG00000062429	<i>trim109</i>	42,18	<b>1,37</b>	7,85E-05
ENSDARG00000079103	<i>MGAT4D</i>	19,84	<b>1,37</b>	0,000194155
ENSDARG00000055787	<i>dzank1</i>	105,62	<b>1,37</b>	1,90E-06
ENSDARG00000078419	<i>filip1a</i>	21,76	<b>1,37</b>	0,000185564
ENSDARG00000095796	<i>si:dkey-87o1.2</i>	58,24	<b>1,37</b>	1,15E-05
ENSDARG00000014311	<i>athl1</i>	184,66	<b>1,36</b>	1,20E-10
ENSDARG00000063578	<i>DGKI</i>	245,02	<b>1,36</b>	2,08E-10
ENSDARG00000055565	<i>cacnb2b</i>	39,11	<b>1,36</b>	6,07E-05
ENSDARG00000097370	<i>si:ch211-235e15.1</i>	865,31	<b>1,36</b>	4,82E-27
ENSDARG00000039512	<i>ap1m3</i>	35,16	<b>1,36</b>	8,87E-05
ENSDARG00000034423	<i>sncga</i>	97,19	<b>1,36</b>	2,45E-06
ENSDARG00000070157	<i>tgm2a</i>	24,70	<b>1,36</b>	0,000194251
ENSDARG00000012981	<i>osbp17</i>	97,70	<b>1,36</b>	2,23E-07
ENSDARG00000040893	<i>bmper</i>	199,09	<b>1,36</b>	1,23E-08
ENSDARG00000016343	<i>zgc:92518</i>	57,79	<b>1,36</b>	1,59E-05
ENSDARG00000078550	<i>zgc:194839</i>	22,30	<b>1,36</b>	0,000198254
ENSDARG00000027966	<i>ap1s3b</i>	30,13	<b>1,36</b>	0,000145513
ENSDARG00000045172	<i>minpp1b</i>	59,12	<b>1,36</b>	1,04E-05
ENSDARG00000061259	<i>sost</i>	637,30	<b>1,36</b>	1,52E-14
ENSDARG00000003399	<i>fgf8a</i>	402,55	<b>1,36</b>	5,57E-14
ENSDARG00000004930	<i>lmo7a</i>	90,15	<b>1,35</b>	7,61E-07
ENSDARG00000035178	<i>gna14</i>	21,50	<b>1,35</b>	0,000212283

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000024141	<i>cav3</i>	60,43	<b>1,35</b>	1,59E-05
ENSDARG00000051762	<i>DNAJA4</i>	284,62	<b>1,35</b>	3,64E-12
ENSDARG00000040912	<i>kdelr3</i>	171,41	<b>1,35</b>	8,80E-10
ENSDARG00000026149	<i>slc46a1</i>	65,36	<b>1,35</b>	1,18E-05
ENSDARG00000062974	<i>itga2.2</i>	23,91	<b>1,35</b>	0,000205073
ENSDARG00000071353	<i>AL929007.1</i>	777,74	<b>1,35</b>	2,71E-21
ENSDARG00000076126	<i>hm:zewp0073</i>	75,24	<b>1,35</b>	8,02E-06
ENSDARG00000035095	<i>oep</i>	66,08	<b>1,34</b>	6,34E-06
ENSDARG00000092998	<i>si:ch211-202f5.3</i>	16,64	<b>1,34</b>	0,000251168
ENSDARG00000060526	<i>bmp3</i>	61,53	<b>1,34</b>	9,95E-06
ENSDARG00000061407	<i>megf8</i>	49,05	<b>1,34</b>	3,26E-05
ENSDARG00000028213	<i>ttna</i>	1136,71	<b>1,34</b>	7,57E-17
ENSDARG00000069833	<i>rhbdl2</i>	50,83	<b>1,34</b>	4,18E-05
ENSDARG00000032630	<i>neb</i>	425,41	<b>1,34</b>	6,32E-12
ENSDARG00000042055	<i>fam129aa</i>	80,68	<b>1,34</b>	6,21E-06
ENSDARG00000070950	<i>STYK1 (2 of 2)</i>	10,63	<b>1,34</b>	0,000147845
ENSDARG00000059795	<i>THEM6 (2 of 2)</i>	26,79	<b>1,34</b>	0,000201524
ENSDARG00000059746	<i>plod1a</i>	735,93	<b>1,33</b>	5,49E-18
ENSDARG00000024116	<i>vamp8</i>	125,11	<b>1,33</b>	1,02E-07
ENSDARG00000053773	<i>vgll2b</i>	52,11	<b>1,33</b>	4,70E-05
ENSDARG00000059123	<i>plcd1a</i>	71,66	<b>1,33</b>	5,27E-06
ENSDARG00000051809	<i>btr12</i>	62,84	<b>1,33</b>	1,93E-05
ENSDARG00000005372	<i>camk4</i>	40,21	<b>1,33</b>	0,000106247
ENSDARG00000069660	<i>chrnb1</i>	29,24	<b>1,33</b>	0,000201524
ENSDARG00000012044	<i>polr3gla</i>	53,28	<b>1,33</b>	2,64E-05
ENSDARG00000057648	<i>dnttip2</i>	4248,40	<b>1,33</b>	4,70E-40
ENSDARG00000035630	<i>ypel1</i>	444,96	<b>1,33</b>	6,57E-15
ENSDARG00000042652	<i>rreb1b</i>	1148,13	<b>1,32</b>	4,06E-19
ENSDARG00000056922	<i>ltbp1</i>	89,78	<b>1,32</b>	1,62E-06
ENSDARG00000078072	<i>si:ch211-232i5.1</i>	28,02	<b>1,31</b>	0,000251326
ENSDARG00000069608	<i>palm2</i>	227,99	<b>1,31</b>	3,77E-11
ENSDARG00000021787	<i>abcb5</i>	113,80	<b>1,31</b>	1,29E-07
ENSDARG00000070743	<i>TMEM45A</i>	115,24	<b>1,31</b>	1,75E-07
ENSDARG00000016867	<i>rnf128a</i>	112,02	<b>1,31</b>	1,38E-07
ENSDARG00000074930	<i>MSMP</i>	76,34	<b>1,30</b>	1,81E-05
ENSDARG00000030494	<i>hfe2</i>	134,48	<b>1,30</b>	1,50E-06
ENSDARG00000000563	<i>ttnb</i>	1094,99	<b>1,30</b>	7,84E-18
ENSDARG00000038305	<i>VGLL3</i>	27,91	<b>1,30</b>	0,000316518
ENSDARG00000008982	<i>casq2</i>	72,83	<b>1,30</b>	1,16E-05
ENSDARG00000080006	<i>tmem41b</i>	204,19	<b>1,30</b>	7,31E-10
ENSDARG00000075951	<i>CABZ01072534.1</i>	18,82	<b>1,30</b>	0,000433997
ENSDARG00000088549	<i>si:ch73-25i22.2</i>	24,43	<b>1,30</b>	0,000388202
ENSDARG00000093569	<i>bckdhbl</i>	250,81	<b>1,29</b>	3,67E-09
ENSDARG00000015010	<i>CCDC114</i>	102,29	<b>1,29</b>	6,78E-06
ENSDARG00000071576	<i>si:dkey-102c8.3</i>	17,49	<b>1,29</b>	0,000448397
ENSDARG00000087769	<i>RBM20</i>	66,02	<b>1,29</b>	2,00E-05
ENSDARG00000019874	<i>hsph1</i>	190,09	<b>1,29</b>	5,04E-09
ENSDARG00000061709	<i>CABZ01069344.1</i>	85,28	<b>1,29</b>	2,62E-06

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000087437	<i>crygn1</i>	18,42	<b>1,29</b>	0,00047193
ENSDARG00000012341	<i>capn9</i>	430,88	<b>1,29</b>	2,62E-16
ENSDARG00000059259	<i>pabpc4</i>	393,66	<b>1,29</b>	1,69E-14
ENSDARG00000088248	<i>RAB11FIP5 (1 of 2)</i>	111,72	<b>1,29</b>	3,86E-07
ENSDARG00000012030	<i>dnaaf1</i>	45,25	<b>1,29</b>	0,000175657
ENSDARG00000038119	<i>si:dkey-65j6.2</i>	33,56	<b>1,29</b>	0,000262832
ENSDARG00000041294	<i>noxo1a</i>	101,67	<b>1,29</b>	1,96E-06
ENSDARG00000044132	<i>ogn</i>	32,74	<b>1,29</b>	0,00038862
ENSDARG00000035327	<i>ckma</i>	480,05	<b>1,29</b>	0,000168486
ENSDARG00000075825	<i>dlec1</i>	55,62	<b>1,28</b>	0,000116364
ENSDARG00000053003	<i>slc35f1</i>	496,32	<b>1,28</b>	2,62E-14
ENSDARG00000043010	<i>camk2d1</i>	143,30	<b>1,28</b>	4,28E-07
ENSDARG00000016897	<i>fbxo15</i>	26,32	<b>1,28</b>	0,000451966
ENSDARG00000079462	ENSDARG00000079462	71,82	<b>1,28</b>	3,61E-05
ENSDARG00000020623	<i>baxa</i>	1743,06	<b>1,28</b>	1,10E-24
ENSDARG00000038205	<i>her2</i>	5667,50	<b>1,28</b>	7,65E-25
ENSDARG00000018814	<i>esrp2</i>	170,68	<b>1,28</b>	1,90E-09
ENSDARG00000021997	<i>C20H6orf165</i>	44,84	<b>1,28</b>	0,000318913
ENSDARG00000053875	<i>cryba1b</i>	124,87	<b>1,28</b>	0,0004708
ENSDARG00000014722	<i>her1</i>	367,23	<b>1,28</b>	2,68E-11
ENSDARG00000040565	<i>ckmb</i>	614,70	<b>1,28</b>	0,000210985
ENSDARG00000070770	<i>her4.3</i>	450,22	<b>1,28</b>	4,70E-17
ENSDARG00000029406	<i>h2afx</i>	441,02	<b>1,28</b>	8,96E-17
ENSDARG00000022615	ENSDARG00000022615	12,88	<b>1,27</b>	0,000448397
ENSDARG00000077818	<i>nrg2a</i>	29,27	<b>1,27</b>	0,000350189
ENSDARG00000090268	<i>si:dkeyp-113d7.4</i>	32,26	<b>1,27</b>	0,000396972
ENSDARG00000068503	<i>gbgt114</i>	71,33	<b>1,27</b>	1,96E-05
ENSDARG00000078696	<i>synpo21b</i>	137,20	<b>1,27</b>	2,45E-06
ENSDARG00000059574	<i>fscn2a</i>	33,08	<b>1,27</b>	0,000406116
ENSDARG00000044695	ENSDARG00000044695	52,17	<b>1,27</b>	0,00011595
ENSDARG00000052215	<i>btr02</i>	13,97	<b>1,27</b>	0,000525638
ENSDARG00000030722	<i>xirp1</i>	118,54	<b>1,27</b>	7,32E-06
ENSDARG00000000349	<i>C21H11orf70</i>	78,14	<b>1,27</b>	1,19E-05
ENSDARG00000008697	<i>epas1a</i>	95,56	<b>1,27</b>	4,08E-06
ENSDARG00000014196	<i>myl1</i>	373,08	<b>1,27</b>	0,000184801
ENSDARG00000034541	<i>tgfbr2</i>	124,17	<b>1,26</b>	6,30E-07
ENSDARG00000011821	<i>plod2</i>	543,33	<b>1,26</b>	3,78E-18
ENSDARG00000052738	<i>hmgcs1</i>	184,57	<b>1,26</b>	9,54E-10
ENSDARG00000015797	<i>mmp13b</i>	13,11	<b>1,26</b>	0,000430544
ENSDARG00000053535	<i>lmo7b</i>	69,23	<b>1,26</b>	2,06E-05
ENSDARG00000045842	<i>zgc:113263</i>	662,06	<b>1,26</b>	1,42E-11
ENSDARG00000019062	<i>arpc5b</i>	497,89	<b>1,26</b>	1,75E-14
ENSDARG00000039997	<i>ptp4a3</i>	1201,51	<b>1,26</b>	1,48E-27
ENSDARG00000012796	<i>hnmt</i>	102,53	<b>1,26</b>	4,66E-06
ENSDARG00000037840	<i>actc1b</i>	2406,72	<b>1,26</b>	6,58E-05
ENSDARG00000044556	<i>pacs1a</i>	262,92	<b>1,26</b>	8,73E-11
ENSDARG00000040432	<i>klf2b</i>	154,10	<b>1,26</b>	6,90E-08
ENSDARG00000059231	<i>heph11</i>	927,39	<b>1,26</b>	3,57E-14

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000013415	<i>lmna</i>	317,83	<b>1,26</b>	7,05E-13
ENSDARG00000086103	<i>slc37a1</i>	60,22	<b>1,25</b>	8,29E-05
ENSDARG00000020795	<i>rac3b</i>	1142,46	<b>1,25</b>	4,65E-21
ENSDARG00000067958	<i>sh3gl1a</i>	44,26	<b>1,25</b>	0,000201524
ENSDARG00000016875	<i>gys1</i>	57,01	<b>1,25</b>	0,000175622
ENSDARG00000093019	<i>si:dkey-83k24.5</i>	117,48	<b>1,25</b>	2,50E-05
ENSDARG00000096990	<i>si:ch1073-340i21.2</i>	22,25	<b>1,25</b>	0,000682322
ENSDARG00000034443	<i>mpped2</i>	818,31	<b>1,25</b>	1,24E-14
ENSDARG00000077301	<i>mlf1</i>	51,56	<b>1,25</b>	0,000138379
ENSDARG00000006981	<i>ccdc113</i>	21,07	<b>1,25</b>	0,000744428
ENSDARG00000056468	<i>asb16</i>	26,43	<b>1,25</b>	0,000636376
ENSDARG00000052000	<i>cav2</i>	43,91	<b>1,25</b>	0,00024708
ENSDARG00000037655	<i>pls3</i>	1074,92	<b>1,24</b>	2,38E-21
ENSDARG00000035198	<i>gcnt4a</i>	20,30	<b>1,24</b>	0,000798131
ENSDARG00000016364	<i>gna15.1</i>	69,02	<b>1,24</b>	3,36E-05
ENSDARG00000055009	<i>col4a1</i>	140,17	<b>1,24</b>	3,15E-07
ENSDARG00000073684	<i>quo</i>	180,69	<b>1,24</b>	1,92E-07
ENSDARG00000041119	<i>ceacam1</i>	31,09	<b>1,24</b>	0,000612915
ENSDARG00000045948	<i>cap2</i>	69,55	<b>1,24</b>	5,98E-05
ENSDARG00000032079	<i>acsl3a</i>	17,72	<b>1,24</b>	0,000842178
ENSDARG00000074183	ENSDARG00000074183	84,27	<b>1,24</b>	1,84E-05
ENSDARG00000062372	<i>nrd1</i>	227,75	<b>1,24</b>	3,47E-10
ENSDARG00000055046	<i>ponzr5</i>	16,63	<b>1,24</b>	0,000812725
ENSDARG00000070535	<i>rippy2</i>	18,45	<b>1,24</b>	0,000861183
ENSDARG00000087804	<i>CT573348.1</i>	102,24	<b>1,23</b>	2,01E-06
ENSDARG00000073789	<i>BX537350.1</i>	23,61	<b>1,23</b>	0,000781017
ENSDARG00000002445	<i>prdm1a</i>	339,61	<b>1,23</b>	1,40E-10
ENSDARG00000074604	<i>phc3</i>	28,46	<b>1,23</b>	0,000797324
ENSDARG00000090028	<i>btr30</i>	70,64	<b>1,23</b>	4,35E-05
ENSDARG00000058940	<i>C8H9orf116</i>	35,13	<b>1,23</b>	0,000512905
ENSDARG00000009133	<i>myo1eb</i>	210,79	<b>1,23</b>	2,73E-09
ENSDARG00000060626	<i>dgkaa</i>	375,74	<b>1,23</b>	1,63E-13
ENSDARG00000068182	<i>crb3b</i>	18,82	<b>1,23</b>	0,00095131
ENSDARG00000043457	<i>gapdh</i>	216,11	<b>1,23</b>	4,07E-07
ENSDARG00000037267	<i>zgc:158263</i>	29,71	<b>1,23</b>	0,000628183
ENSDARG00000068732	<i>spry4</i>	1130,87	<b>1,23</b>	4,04E-21
ENSDARG00000008107	<i>src</i>	436,32	<b>1,22</b>	3,53E-15
ENSDARG00000086881	<i>IER2</i>	195,69	<b>1,22</b>	1,22E-08
ENSDARG00000031809	<i>rhm24b</i>	214,35	<b>1,22</b>	6,41E-09
ENSDARG00000043518	<i>si:dkey-239i20.2</i>	156,14	<b>1,22</b>	2,88E-07
ENSDARG00000094324	<i>efemp2a</i>	1372,34	<b>1,22</b>	2,48E-15
ENSDARG00000062978	<i>ccdc151</i>	86,05	<b>1,22</b>	5,65E-05
ENSDARG00000063050	<i>rc3h2</i>	34,49	<b>1,22</b>	0,000493485
ENSDARG00000024746	<i>hsp90aa1.2</i>	5347,11	<b>1,22</b>	3,52E-07
ENSDARG00000068856	<i>f2rl1.1</i>	17,89	<b>1,22</b>	0,001012293
ENSDARG00000077836	<i>ttc22</i>	13,47	<b>1,22</b>	0,000883837
ENSDARG00000008816	<i>glud1a</i>	243,89	<b>1,22</b>	9,32E-11
ENSDARG00000060610	<i>pcdh7b</i>	390,19	<b>1,22</b>	8,13E-12

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000040628	<i>CLDN17</i>	72,09	<b>1,22</b>	4,83E-05
ENSDARG00000037000	<i>fkbp11</i>	109,52	<b>1,22</b>	3,89E-06
ENSDARG00000060845	<i>antxr1d</i>	68,01	<b>1,22</b>	8,28E-05
ENSDARG00000004497	<i>tspan33</i>	38,38	<b>1,21</b>	0,000469018
ENSDARG00000096886	<i>HEP1L1 (3 of 3)</i>	189,90	<b>1,21</b>	2,65E-07
ENSDARG00000077303	<i>zgc:174863</i>	217,27	<b>1,21</b>	6,05E-09
ENSDARG00000045524	<i>lamb1b</i>	133,42	<b>1,21</b>	1,19E-06
ENSDARG00000019995	<i>bmp4</i>	171,41	<b>1,21</b>	1,61E-08
ENSDARG00000028000	<i>pfkpa</i>	88,10	<b>1,21</b>	2,21E-05
ENSDARG00000040064	<i>acp6</i>	89,54	<b>1,21</b>	1,59E-05
ENSDARG00000071235	<i>si:ch211-117c9.5</i>	179,19	<b>1,21</b>	4,69E-07
ENSDARG00000057437	<i>APOD (1 of 3)</i>	27,90	<b>1,20</b>	0,000864269
ENSDARG00000059060	<i>lgalsla</i>	30,96	<b>1,20</b>	0,000770793
ENSDARG00000077461	<i>dhx32a</i>	50,28	<b>1,20</b>	0,000185237
ENSDARG00000043802	<i>ms4a17a.9</i>	29,30	<b>1,20</b>	0,000938804
ENSDARG00000060994	<i>FBXW7</i>	3453,63	<b>1,20</b>	1,53E-21
ENSDARG00000096995	<i>fbxl22</i>	36,47	<b>1,20</b>	0,000800998
ENSDARG00000092726	<i>si:dkey-184p9.7</i>	20,50	<b>1,20</b>	0,001248957
ENSDARG00000022101	<i>OBSCN (1 of 2)</i>	120,93	<b>1,20</b>	5,56E-06
ENSDARG00000094719	<i>si:dkeyp-1h4.9</i>	17,27	<b>1,19</b>	0,001325582
ENSDARG00000015263	<i>adma</i>	196,96	<b>1,19</b>	1,90E-07
ENSDARG00000061233	<i>abcc5</i>	6613,19	<b>1,19</b>	6,38E-22
ENSDARG00000008423	<i>tfec</i>	40,78	<b>1,19</b>	0,000442935
ENSDARG00000077372	<i>tfr1b</i>	132,68	<b>1,19</b>	3,93E-07
ENSDARG00000032976	<i>cm1c1</i>	14,04	<b>1,19</b>	0,00105494
ENSDARG00000068219	<i>b3gnt2l</i>	37,22	<b>1,19</b>	0,00054402
ENSDARG00000061095	<i>stk36</i>	437,11	<b>1,19</b>	1,09E-11
ENSDARG00000090099	<i>si:dkeyp-67a8.4</i>	11,45	<b>1,19</b>	0,001022085
ENSDARG00000016062	ENSDARG00000016062	64,57	<b>1,19</b>	9,46E-05
ENSDARG00000076547	ENSDARG00000076547	57,26	<b>1,19</b>	0,000153573
ENSDARG00000028367	<i>sult2st3</i>	60,91	<b>1,19</b>	9,20E-05
ENSDARG00000039914	<i>gapdhs</i>	2701,96	<b>1,19</b>	5,49E-23
ENSDARG00000036943	<i>golp3l</i>	38,38	<b>1,19</b>	0,000503488
ENSDARG00000039490	<i>pitpnaa</i>	196,20	<b>1,19</b>	1,25E-08
ENSDARG00000092899	<i>si:dkey-33i11.4</i>	25,60	<b>1,19</b>	0,001453869
ENSDARG00000003811	<i>plxnb2a</i>	1303,41	<b>1,18</b>	6,67E-18
ENSDARG00000041339	<i>zgc:92380</i>	132,21	<b>1,18</b>	1,17E-05
ENSDARG00000036966	<i>hsd3b7</i>	31,89	<b>1,18</b>	0,001116378
ENSDARG00000026548	<i>cyp2u1</i>	30,59	<b>1,18</b>	0,001017081
ENSDARG00000074663	<i>zgc:162183</i>	54,89	<b>1,18</b>	0,000208808
ENSDARG00000074708	<i>BX469922.1</i>	89,26	<b>1,18</b>	0,000120154
ENSDARG00000093073	<i>si:dkeyp-7g10.2</i>	20,60	<b>1,18</b>	0,001528064
ENSDARG00000043936	<i>ANXA1 (4 of 4)</i>	32,78	<b>1,18</b>	0,00093695
ENSDARG00000075831	<i>SLC7A8B</i>	444,47	<b>1,18</b>	2,47E-13
ENSDARG00000057227	<i>si:dkey-222b8.4</i>	67,99	<b>1,18</b>	0,00013641
ENSDARG00000019564	<i>asap2b</i>	118,52	<b>1,18</b>	2,10E-06
ENSDARG00000015273	<i>alpi.1</i>	80,68	<b>1,18</b>	6,09E-05
ENSDARG00000005423	<i>pgam1a</i>	541,51	<b>1,17</b>	3,78E-11



Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000011824	<i>pbxip1b</i>	174,64	<b>1,17</b>	1,96E-07
ENSDARG00000036876	<i>zgc:153284</i>	24,48	<b>1,17</b>	0,001374568
ENSDARG00000045075	<i>tmem106a</i>	125,38	<b>1,17</b>	1,19E-06
ENSDARG00000031929	<i>stard10</i>	106,15	<b>1,17</b>	5,50E-06
ENSDARG00000044155	<i>mafa</i>	168,81	<b>1,17</b>	4,60E-07
ENSDARG00000006982	<i>msxd</i>	100,36	<b>1,17</b>	1,34E-05
ENSDARG00000035519	<i>histh1l</i>	3553,63	<b>1,17</b>	8,31E-06
ENSDARG00000096826	<i>si:ch211-278n20.8</i>	9,00	<b>1,17</b>	0,000565437
ENSDARG00000076833	<i>atp1b1b</i>	133,90	<b>1,17</b>	1,21E-05
ENSDARG00000095388	<i>si:ch211-42i9.5</i>	16,17	<b>1,17</b>	0,001627288
ENSDARG00000055518	<i>pygma</i>	75,02	<b>1,17</b>	0,000106163
ENSDARG00000051879	<i>abcc8</i>	219,24	<b>1,17</b>	7,85E-08
ENSDARG00000004392	<i>hdr</i>	66,09	<b>1,17</b>	9,27E-05
ENSDARG00000060397	<i>hhip</i>	1048,76	<b>1,17</b>	7,67E-22
ENSDARG00000059484	<i>hip1rb</i>	206,16	<b>1,17</b>	1,03E-08
ENSDARG00000024546	<i>cpla2</i>	113,95	<b>1,17</b>	4,42E-06
ENSDARG00000042760	<i>stk10</i>	81,12	<b>1,17</b>	3,60E-05
ENSDARG00000067606	<i>rsph4a</i>	175,96	<b>1,16</b>	2,75E-07
ENSDARG00000097877	<i>si:ch211-167b20.8</i>	170,09	<b>1,16</b>	1,50E-07
ENSDARG00000094088	<i>si:ch211-229n2.7</i>	11,07	<b>1,16</b>	0,001173465
ENSDARG00000071024	ENSDARG00000071024	55,77	<b>1,16</b>	0,000194251
ENSDARG00000009194	<i>col16a1</i>	563,85	<b>1,16</b>	8,13E-16
ENSDARG00000091916	<i>ugt5b4</i>	39,41	<b>1,16</b>	0,000672795
ENSDARG00000086957	<i>si:dkeyp-118a3.2</i>	30,21	<b>1,16</b>	0,001390103
ENSDARG00000068934	<i>cyp1b1</i>	86,86	<b>1,16</b>	5,24E-05
ENSDARG00000018008	<i>mdh1b</i>	27,94	<b>1,16</b>	0,001389184
ENSDARG00000079671	<i>lppr4a</i>	38,35	<b>1,16</b>	0,000836595
ENSDARG00000045705	<i>meig1</i>	103,46	<b>1,16</b>	9,16E-06
ENSDARG00000075164	<i>im:7148400</i>	367,60	<b>1,16</b>	8,20E-13
ENSDARG00000007576	<i>crybb1l1</i>	56,30	<b>1,16</b>	0,001367981
ENSDARG00000057975	<i>plcd4a</i>	60,07	<b>1,15</b>	0,000272245
ENSDARG00000017010	<i>scamp2l</i>	29,33	<b>1,15</b>	0,001641479
ENSDARG00000073786	<i>cmbl</i>	16,23	<b>1,15</b>	0,001907565
ENSDARG00000032319	<i>mest</i>	63,76	<b>1,15</b>	0,000140913
ENSDARG00000002330	<i>lhx8a</i>	26,35	<b>1,15</b>	0,001595253
ENSDARG00000088164	<i>DOK7 (2 of 2)</i>	27,91	<b>1,15</b>	0,001438543
ENSDARG00000063690	<i>nrm</i>	154,67	<b>1,15</b>	2,46E-06
ENSDARG00000058631	<i>CABZ01030107.1</i>	119,15	<b>1,15</b>	4,65E-06
ENSDARG00000005463	<i>slc30a1a</i>	740,56	<b>1,15</b>	5,78E-17
ENSDARG00000055618	<i>acta1b</i>	461,88	<b>1,15</b>	0,000214635
ENSDARG00000054842	<i>hsd17b14</i>	73,47	<b>1,15</b>	7,73E-05
ENSDARG00000010255	<i>bin2b</i>	71,43	<b>1,15</b>	0,000118733
ENSDARG00000019487	<i>tmx1</i>	266,34	<b>1,15</b>	2,54E-10
ENSDARG00000078733	<i>CNNM2 (2 of 2)</i>	31,15	<b>1,15</b>	0,001271841
ENSDARG00000014358	<i>optc</i>	289,60	<b>1,15</b>	1,91E-10
ENSDARG00000074094	<i>tgm2b</i>	68,25	<b>1,15</b>	0,000180221
ENSDARG00000044092	<i>atpif1b</i>	404,21	<b>1,15</b>	1,99E-13
ENSDARG00000013755	<i>actn3a</i>	103,19	<b>1,15</b>	6,59E-05

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000090337	<i>pprc1</i>	3015,76	<b>1,15</b>	8,56E-27
ENSDARG00000071360	<i>morn2</i>	35,69	<b>1,14</b>	0,00111393
ENSDARG00000014670	<i>colgalt2</i>	88,85	<b>1,14</b>	6,71E-05
ENSDARG00000051975	<i>cd99</i>	95,92	<b>1,14</b>	5,58E-05
ENSDARG00000079996	<i>stac3</i>	31,06	<b>1,14</b>	0,001695627
ENSDARG00000029668	<i>crim1</i>	304,45	<b>1,14</b>	3,99E-09
ENSDARG00000015355	<i>fosl1a</i>	6333,17	<b>1,14</b>	1,25E-19
ENSDARG00000012467	<i>spint1b</i>	77,15	<b>1,14</b>	7,94E-05
ENSDARG00000090456	<i>GPC1 (2 of 3)</i>	20,10	<b>1,14</b>	0,002242324
ENSDARG00000062359	<i>scn3b</i>	53,12	<b>1,14</b>	0,000407917
ENSDARG00000077169	<i>wu:fj08f03</i>	34,83	<b>1,14</b>	0,001540625
ENSDARG00000017355	<i>rsph9</i>	106,14	<b>1,14</b>	1,32E-05
ENSDARG00000086539	<i>CABZ01115881.1</i>	37,25	<b>1,14</b>	0,001138155
ENSDARG00000074626	<i>pidd</i>	200,89	<b>1,14</b>	9,07E-08
ENSDARG00000030961	<i>ak8</i>	51,12	<b>1,14</b>	0,000418683
ENSDARG00000027611	<i>sdpra</i>	175,06	<b>1,14</b>	1,20E-06
ENSDARG00000071672	ENSDARG00000071672	77,35	<b>1,14</b>	8,17E-05
ENSDARG00000037415	<i>dlgap1b</i>	100,46	<b>1,14</b>	3,46E-05
ENSDARG00000056379	<i>si:ch211-154o6.6</i>	88,43	<b>1,13</b>	9,46E-05
ENSDARG00000078853	<i>arhgef19</i>	231,82	<b>1,13</b>	1,69E-08
ENSDARG00000040133	<i>ackr4b</i>	28,26	<b>1,13</b>	0,001973027
ENSDARG00000052652	<i>fermt1</i>	158,72	<b>1,13</b>	2,41E-06
ENSDARG00000061830	<i>prss12</i>	228,25	<b>1,13</b>	9,99E-09
ENSDARG00000041321	<i>wdr16</i>	134,82	<b>1,13</b>	7,74E-06
ENSDARG00000018281	<i>C18H15orf26</i>	25,20	<b>1,13</b>	0,002133175
ENSDARG00000089858	<i>COBLL1 (2 of 2)</i>	10,35	<b>1,13</b>	0,001511034
ENSDARG00000043470	<i>rsph3</i>	36,55	<b>1,12</b>	0,001320412
ENSDARG00000053136	<i>b2m</i>	166,90	<b>1,12</b>	5,12E-07
ENSDARG00000086685	ENSDARG00000086685	80,27	<b>1,12</b>	0,000187513
ENSDARG00000015686	<i>bmp6</i>	49,57	<b>1,12</b>	0,000677375
ENSDARG00000046019	<i>snai1b</i>	42,92	<b>1,12</b>	0,000957238
ENSDARG00000074316	<i>itga1</i>	79,90	<b>1,12</b>	0,00023551
ENSDARG00000041190	ENSDARG00000041190	71,77	<b>1,12</b>	0,000244344
ENSDARG00000053483	<i>zgc:113054</i>	385,21	<b>1,12</b>	2,98E-11
ENSDARG00000041952	<i>prox2</i>	668,73	<b>1,12</b>	4,35E-14
ENSDARG00000058358	<i>krt8</i>	9136,80	<b>1,12</b>	2,78E-20
ENSDARG00000052427	<i>CCDC64B</i>	32,04	<b>1,12</b>	0,002058469
ENSDARG00000041394	<i>dnajb1b</i>	1518,37	<b>1,12</b>	5,49E-23
ENSDARG00000062054	<i>CPT1A (2 of 2)</i>	638,28	<b>1,12</b>	2,98E-15
ENSDARG00000070526	<i>zc2hc1c</i>	112,79	<b>1,12</b>	7,43E-05
ENSDARG00000096717	<i>si:rp71-1c10.7</i>	70,89	<b>1,11</b>	0,000140249
ENSDARG00000039098	<i>ca8</i>	136,60	<b>1,11</b>	1,66E-05
ENSDARG00000094510	<i>rab11fip5a</i>	22,20	<b>1,11</b>	0,002814394
ENSDARG00000095434	<i>si:ch211-217k17.8</i>	18,58	<b>1,11</b>	0,003031534
ENSDARG00000005670	<i>ttbk2</i>	107,88	<b>1,11</b>	2,81E-05
ENSDARG00000086142	<i>arhgap27</i>	26,18	<b>1,11</b>	0,002547478
ENSDARG00000053381	<i>PPAP2A</i>	132,16	<b>1,11</b>	4,45E-06
ENSDARG00000008884	<i>hprt1</i>	395,99	<b>1,11</b>	2,68E-12

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000020326	<i>tyk2</i>	108,45	<b>1,11</b>	0,000117911
ENSDARG00000070626	<i>cacng8b</i>	192,00	<b>1,11</b>	8,55E-06
ENSDARG00000079675	<i>SYNPO2 (2 of 2)</i>	20,18	<b>1,11</b>	0,003225776
ENSDARG00000097006	<i>si:dkey-54h16.1</i>	21,14	<b>1,11</b>	0,00322725
ENSDARG00000013526	<i>SVEP1</i>	125,59	<b>1,10</b>	1,03E-05
ENSDARG00000070442	<i>si:ch211-113g11.6</i>	902,56	<b>1,10</b>	0,000250085
ENSDARG00000055412	<i>mylk4b</i>	11,13	<b>1,10</b>	0,002406847
ENSDARG00000012281	ENSDARG00000012281	54,49	<b>1,10</b>	0,000757862
ENSDARG00000046124	<i>rab11fip1a</i>	66,13	<b>1,10</b>	0,000248809
ENSDARG00000086254	<i>HHLA2 (3 of 4)</i>	19,81	<b>1,10</b>	0,003337324
ENSDARG00000017229	<i>megf10</i>	90,58	<b>1,10</b>	0,000157945
ENSDARG00000056938	<i>kerA</i>	154,14	<b>1,10</b>	0,000107578
ENSDARG00000022456	<i>eno1a</i>	1126,05	<b>1,10</b>	4,99E-14
ENSDARG00000078244	<i>SOGA1 (2 of 2)</i>	157,24	<b>1,10</b>	9,81E-07
ENSDARG00000014323	<i>zgc:91849</i>	82,16	<b>1,10</b>	0,000160889
ENSDARG00000037647	<i>rnf175</i>	235,71	<b>1,10</b>	7,43E-09
ENSDARG00000074414	<i>sema4ba</i>	860,54	<b>1,10</b>	6,77E-12
ENSDARG00000077540	<i>f2rl1.2</i>	55,00	<b>1,10</b>	0,000627922
ENSDARG00000035326	<i>nccrp1</i>	63,87	<b>1,10</b>	0,000330037
ENSDARG00000039750	<i>ldlrp1b</i>	68,19	<b>1,10</b>	0,000495475
ENSDARG00000033428	<i>twsq1a</i>	334,84	<b>1,10</b>	2,12E-08
ENSDARG00000032856	<i>ccdc120</i>	203,67	<b>1,10</b>	5,71E-07
ENSDARG00000040190	<i>qdpra</i>	138,40	<b>1,10</b>	4,06E-06
ENSDARG00000030125	<i>sox7</i>	93,47	<b>1,10</b>	4,86E-05
ENSDARG00000069685	<i>KLF10</i>	16,01	<b>1,10</b>	0,003161266
ENSDARG00000039459	<i>qsox1</i>	154,77	<b>1,10</b>	1,44E-06
ENSDARG00000041300	<i>lrrc48</i>	63,14	<b>1,10</b>	0,00082308
ENSDARG00000038694	<i>zgc:101744</i>	60,48	<b>1,09</b>	0,000511475
ENSDARG00000015575	<i>cyp3c1</i>	112,51	<b>1,09</b>	5,05E-05
ENSDARG00000093684	<i>tmem238</i>	30,98	<b>1,09</b>	0,002528958
ENSDARG00000055569	<i>ghdc</i>	27,08	<b>1,09</b>	0,002769042
ENSDARG00000020541	<i>ism1</i>	434,08	<b>1,09</b>	6,81E-12
ENSDARG00000029596	<i>trim55a</i>	28,74	<b>1,09</b>	0,002871257
ENSDARG00000079059	<i>BX323064.1</i>	53,76	<b>1,09</b>	0,000760906
ENSDARG00000021149	<i>cbr1l</i>	737,93	<b>1,09</b>	1,09E-14
ENSDARG00000015654	<i>ca15a</i>	24,48	<b>1,09</b>	0,003255694
ENSDARG00000018342	<i>ggt1b</i>	23,92	<b>1,09</b>	0,003654081
ENSDARG00000000666	<i>creg2</i>	508,45	<b>1,09</b>	1,90E-11
ENSDARG00000062501	<i>hhip1l</i>	61,19	<b>1,08</b>	0,000609266
ENSDARG00000074163	<i>zgc:162879</i>	34,65	<b>1,08</b>	0,002242324
ENSDARG00000076960	<i>PAQR4 (2 of 2)</i>	28,49	<b>1,08</b>	0,003097663
ENSDARG00000057992	<i>fstb</i>	44,89	<b>1,08</b>	0,001465533
ENSDARG00000024030	<i>angptl2a</i>	23,22	<b>1,08</b>	0,003645985
ENSDARG00000075177	<i>ribc2</i>	121,61	<b>1,08</b>	9,11E-05
ENSDARG00000044776	<i>clica</i>	47,45	<b>1,08</b>	0,001338539
ENSDARG00000016233	<i>sdr16c5a</i>	357,30	<b>1,08</b>	2,57E-11
ENSDARG00000021147	<i>nipal3</i>	111,73	<b>1,08</b>	2,89E-05
ENSDARG00000022165	<i>mgst1.2</i>	21,94	<b>1,08</b>	0,003850875

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000063295	<i>myh9a</i>	1251,18	<b>1,08</b>	4,54E-11
ENSDARG00000055838	<i>mettl16</i>	359,71	<b>1,08</b>	3,86E-07
ENSDARG00000027807	<i>fynrk</i>	262,79	<b>1,08</b>	2,94E-08
ENSDARG00000019130	<i>plk2b</i>	86,03	<b>1,08</b>	0,000203893
ENSDARG00000014587	<i>slc38a5b</i>	5512,28	<b>1,08</b>	9,84E-34
ENSDARG00000056262	<i>slc35g2a</i>	74,76	<b>1,08</b>	0,00078596
ENSDARG00000075855	<i>si:ch73-341p18.7</i>	180,74	<b>1,08</b>	3,86E-07
ENSDARG00000056934	<i>hepacam</i>	68,52	<b>1,08</b>	0,000383446
ENSDARG00000079895	<i>ehbp11b</i>	51,12	<b>1,08</b>	0,000938804
ENSDARG00000089358	<i>CABZ01035189.1</i>	31,32	<b>1,08</b>	0,003286533
ENSDARG00000069956	<i>pdlim2</i>	37,33	<b>1,07</b>	0,002095078
ENSDARG00000029859	<i>C8H1orf228</i>	30,84	<b>1,07</b>	0,002769168
ENSDARG00000044968	<i>vcla</i>	38,46	<b>1,07</b>	0,002436318
ENSDARG00000042641	<i>cyp51</i>	305,60	<b>1,07</b>	2,07E-09
ENSDARG00000060754	ENSDARG00000060754	127,55	<b>1,07</b>	6,86E-05
ENSDARG00000070446	<i>RSPH1</i>	108,84	<b>1,07</b>	2,96E-05
ENSDARG00000068397	<i>tenc1b</i>	88,57	<b>1,07</b>	0,000284895
ENSDARG00000063383	<i>dync1i2b</i>	119,29	<b>1,07</b>	2,11E-05
ENSDARG00000054616	<i>cldni</i>	995,40	<b>1,07</b>	0,000252296
ENSDARG00000029930	<i>SPDEF</i>	21,35	<b>1,07</b>	0,00445902
ENSDARG00000079069	<i>DOCK9 (2 of 3)</i>	241,12	<b>1,07</b>	1,62E-08
ENSDARG00000091579	<i>si:ch211-66e2.5</i>	23,52	<b>1,07</b>	0,004028325
ENSDARG00000052330	<i>slc4a2b</i>	478,92	<b>1,07</b>	6,46E-13
ENSDARG00000061301	<i>gmpr2</i>	137,48	<b>1,07</b>	4,59E-06
ENSDARG00000091816	<i>CABZ01088039.1</i>	56,49	<b>1,07</b>	0,001113552
ENSDARG00000006577	<i>nadka</i>	39,23	<b>1,07</b>	0,002435976
ENSDARG00000061303	<i>oca2</i>	45,82	<b>1,07</b>	0,00175999
ENSDARG00000070542	<i>mafbb</i>	122,63	<b>1,07</b>	6,59E-05
ENSDARG00000019001	<i>ak7a</i>	107,73	<b>1,06</b>	0,000209009
ENSDARG00000055381	<i>bambia</i>	162,86	<b>1,06</b>	6,18E-06
ENSDARG00000077369	<i>vwde</i>	47,29	<b>1,06</b>	0,002300073
ENSDARG00000031246	<i>hbegfb</i>	41,93	<b>1,06</b>	0,001915165
ENSDARG00000079175	<i>si:ch211-79k12.1</i>	16,13	<b>1,06</b>	0,004806249
ENSDARG00000019702	<i>aldocb</i>	3008,94	<b>1,06</b>	0,00036264
ENSDARG00000043403	<i>si:dkey-7o6.3</i>	121,08	<b>1,06</b>	5,32E-05
ENSDARG00000060457	<i>pmp22b</i>	178,81	<b>1,06</b>	1,21E-05
ENSDARG00000052271	<i>slc22a18</i>	91,31	<b>1,06</b>	9,28E-05
ENSDARG00000039697	<i>si:ch73-56p18.4</i>	37,64	<b>1,06</b>	0,002525682
ENSDARG00000016439	<i>slc7a1</i>	115,01	<b>1,06</b>	2,84E-05
ENSDARG00000020265	<i>angptl6</i>	26,02	<b>1,06</b>	0,004668533
ENSDARG00000019365	<i>zgc:110712</i>	130,24	<b>1,06</b>	1,88E-05
ENSDARG00000004130	<i>mvk</i>	113,56	<b>1,06</b>	2,21E-05
ENSDARG00000009266	<i>uevld</i>	75,54	<b>1,06</b>	0,000297779
ENSDARG00000094000	<i>si:dkey-153k10.6</i>	47,40	<b>1,06</b>	0,001657985
ENSDARG00000031657	<i>fahd1</i>	103,74	<b>1,06</b>	0,000151496
ENSDARG00000088299	<i>CR388002.2</i>	16,55	<b>1,06</b>	0,004971141
ENSDARG00000089353	<i>wu:fj30f06</i>	92,90	<b>1,06</b>	8,81E-05
ENSDARG00000096720	<i>cpn1</i>	94,50	<b>1,06</b>	0,000377601

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000040214	<i>scrt1b</i>	36,28	<b>1,05</b>	0,003112783
ENSDARG00000018881	<i>apobec2a</i>	47,97	<b>1,05</b>	0,001931708
ENSDARG00000053865	<i>COMP</i>	197,08	<b>1,05</b>	1,05E-05
ENSDARG00000012972	<i>cf11l</i>	879,03	<b>1,05</b>	0,00014525
ENSDARG00000052522	<i>snx11</i>	863,38	<b>1,05</b>	0,000159072
ENSDARG00000070081	<i>rspo3</i>	354,06	<b>1,05</b>	1,00E-10
ENSDARG00000089413	<i>mbpb</i>	156,97	<b>1,05</b>	3,34E-06
ENSDARG00000089954	ENSDARG00000089954	12,80	<b>1,05</b>	0,004774378
ENSDARG00000058548	<i>bves</i>	26,79	<b>1,05</b>	0,004705546
ENSDARG00000076821	<i>MYOM1 (2 of 2)</i>	74,93	<b>1,05</b>	0,000295403
ENSDARG00000037551	<i>pm20d1.1</i>	54,13	<b>1,05</b>	0,001430262
ENSDARG00000070000	<i>txnipb</i>	114,04	<b>1,05</b>	6,23E-05
ENSDARG00000018258	<i>adkb</i>	365,64	<b>1,05</b>	8,52E-10
ENSDARG00000053619	<i>sra1</i>	174,99	<b>1,05</b>	9,72E-07
ENSDARG00000060748	<i>tsfm</i>	374,71	<b>1,04</b>	2,07E-10
ENSDARG00000075343	<i>csf1a</i>	58,85	<b>1,04</b>	0,000975607
ENSDARG00000079317	<i>DLC1</i>	1226,27	<b>1,04</b>	2,69E-20
ENSDARG00000090531	<i>ttc25</i>	38,25	<b>1,04</b>	0,002697002
ENSDARG00000076776	<i>si:ch73-92e20.2</i>	46,47	<b>1,04</b>	0,002090346
ENSDARG00000056767	<i>itgb3a</i>	67,44	<b>1,04</b>	0,001373494
ENSDARG00000024286	<i>spry1</i>	254,56	<b>1,04</b>	6,52E-08
ENSDARG00000003022	<i>limk1b</i>	109,07	<b>1,04</b>	7,74E-05
ENSDARG00000092383	<i>si:dkeyp-12a9.5</i>	146,03	<b>1,04</b>	3,78E-05
ENSDARG00000045898	<i>si:ch211-152c2.3</i>	207,81	<b>1,04</b>	5,41E-05
ENSDARG00000004539	<i>ptgs2a</i>	755,42	<b>1,04</b>	3,72E-08
ENSDARG00000067524	<i>fut9b</i>	20,62	<b>1,04</b>	0,005864776
ENSDARG00000029688	<i>mcm5</i>	45,96	<b>1,04</b>	0,003253957
ENSDARG00000002663	<i>optn</i>	56,16	<b>1,04</b>	0,001199559
ENSDARG00000041065	<i>hsqb1</i>	298,35	<b>1,04</b>	1,39E-08
ENSDARG00000051836	<i>si:dkeyp-19e1.3</i>	86,06	<b>1,04</b>	0,000297735
ENSDARG00000005673	<i>f3b</i>	528,11	<b>1,04</b>	2,60E-12
ENSDARG00000036830	<i>KRT23 (1 of 2)</i>	276,66	<b>1,04</b>	0,004028325
ENSDARG00000071871	<i>GLOD5</i>	76,03	<b>1,04</b>	0,000381346
ENSDARG00000029459	<i>med30</i>	71,61	<b>1,04</b>	0,000464478
ENSDARG00000059064	<i>rassf3</i>	123,94	<b>1,04</b>	2,70E-05
ENSDARG00000096257	<i>si:ch73-367p23.2</i>	51,74	<b>1,04</b>	0,002091684
ENSDARG00000076230	<i>ATP10B</i>	21,90	<b>1,04</b>	0,005922202
ENSDARG00000031164	<i>tuba8l2</i>	642,23	<b>1,04</b>	3,65E-10
ENSDARG00000010515	<i>DVL1 (1 of 3)</i>	36,56	<b>1,03</b>	0,003305602
ENSDARG00000038786	<i>smarcd3a</i>	502,74	<b>1,03</b>	2,46E-07
ENSDARG00000027538	<i>NOXRED1</i>	18,58	<b>1,03</b>	0,00636597
ENSDARG00000029069	<i>tnni2a.4</i>	23,51	<b>1,03</b>	0,00622308
ENSDARG00000088040	<i>MDP1</i>	54,81	<b>1,03</b>	0,001130051
ENSDARG00000022340	<i>ufc1</i>	334,05	<b>1,03</b>	5,70E-09
ENSDARG00000060094	<i>ptgis</i>	23,56	<b>1,03</b>	0,006040637
ENSDARG00000039270	<i>vti1b</i>	155,23	<b>1,03</b>	4,65E-06
ENSDARG00000056998	<i>kirrelb</i>	250,76	<b>1,03</b>	3,35E-08
ENSDARG00000044325	<i>zgc:193690</i>	107,58	<b>1,03</b>	5,62E-05

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000074690	<i>ppm1j</i>	46,20	<b>1,03</b>	0,002252844
ENSDARG00000056029	<i>cyp26c1</i>	1604,51	<b>1,03</b>	5,77E-15
ENSDARG00000040523	<i>smpd2a</i>	29,52	<b>1,03</b>	0,004769928
ENSDARG00000033161	<i>sst1.2</i>	28,06	<b>1,03</b>	0,005692033
ENSDARG00000070560	<i>nap1l4a</i>	1945,61	<b>1,03</b>	1,23E-22
ENSDARG00000007739	<i>atp1a1a.2</i>	91,02	<b>1,03</b>	0,006341806
ENSDARG00000045748	<i>stab2</i>	238,43	<b>1,03</b>	1,08E-05
ENSDARG00000045071	<i>chad</i>	11,19	<b>1,03</b>	0,004774836
ENSDARG00000010276	<i>ptgs2b</i>	94,23	<b>1,03</b>	0,000215399
ENSDARG00000074323	<i>efcab2</i>	29,15	<b>1,03</b>	0,004802767
ENSDARG00000006868	<i>trh</i>	41,11	<b>1,03</b>	0,005211801
ENSDARG00000029738	<i>fbln1</i>	214,08	<b>1,03</b>	2,41E-06
ENSDARG00000010085	<i>p4ha2</i>	733,53	<b>1,03</b>	2,66E-08
ENSDARG000000093759	<i>GPR31</i>	22,63	<b>1,03</b>	0,006800917
ENSDARG00000070868	<i>C23H1orf192</i>	47,88	<b>1,02</b>	0,002037349
ENSDARG00000087596	<i>si:ch73-95l15.5</i>	56,46	<b>1,02</b>	0,001333925
ENSDARG00000001968	<i>dock5</i>	54,49	<b>1,02</b>	0,002028289
ENSDARG00000005901	<i>AIM1L</i>	53,33	<b>1,02</b>	0,002071397
ENSDARG00000014646	<i>aoc2</i>	566,79	<b>1,02</b>	0,000753131
ENSDARG00000069028	ENSDARG00000069028	12,07	<b>1,02</b>	0,005589693
ENSDARG00000040135	<i>c-fos like</i>	379,01	<b>1,02</b>	5,25E-09
ENSDARG00000058800	<i>rab25a</i>	21,71	<b>1,02</b>	0,006846194
ENSDARG00000068095	<i>fgf4</i>	59,20	<b>1,02</b>	0,001164887
ENSDARG00000058857	<i>C18H19orf12 (1 of 3)</i>	692,25	<b>1,01</b>	1,28E-11
ENSDARG00000045517	<i>itih5</i>	13,82	<b>1,01</b>	0,006768508
ENSDARG00000090394	<i>TIMP4</i>	11,51	<b>1,01</b>	0,005738513
ENSDARG00000040295	<i>apoeb</i>	1654,01	<b>1,01</b>	7,32E-12
ENSDARG00000014068	<i>pgam1b</i>	358,47	<b>1,01</b>	4,62E-09
ENSDARG00000076179	<i>NGEF</i>	72,57	<b>1,01</b>	0,000791669
ENSDARG00000086985	<i>klc4</i>	130,31	<b>1,01</b>	5,53E-05
ENSDARG00000088644	<i>CU468041.1</i>	70,86	<b>1,01</b>	0,000971529
ENSDARG00000055238	<i>kif17</i>	21,40	<b>1,01</b>	0,008021665
ENSDARG00000094537	<i>si:ch211-137i24.12</i>	166,18	<b>1,01</b>	6,00E-06
ENSDARG00000056322	<i>ldb3a</i>	106,75	<b>1,01</b>	0,000560075
ENSDARG00000035028	<i>lpcat4</i>	70,46	<b>1,01</b>	0,000776101
ENSDARG00000028027	<i>trim63</i>	57,28	<b>1,01</b>	0,001702726
ENSDARG00000075027	<i>fgfr1bl</i>	80,67	<b>1,01</b>	0,000961138
ENSDARG00000092947	<i>cyt1</i>	2556,02	<b>1,00</b>	0,000281107
ENSDARG00000016598	<i>ckmt1</i>	37,74	<b>1,00</b>	0,005144014
ENSDARG00000041085	<i>C18H15orf38</i>	37,63	<b>1,00</b>	0,004369001
ENSDARG00000058561	<i>fbxo30a</i>	298,65	<b>1,00</b>	2,15E-08
ENSDARG00000071518	<i>KRT222</i>	62,75	<b>1,00</b>	0,002086553
ENSDARG00000010250	<i>nqo1</i>	77,70	<b>1,00</b>	0,000463639
ENSDARG00000052429	<i>syng2a</i>	214,43	<b>1,00</b>	1,68E-06
ENSDARG00000017261	<i>gdpd1</i>	150,84	<b>1,00</b>	1,10E-05
ENSDARG00000026052	<i>ccdc3</i>	50,70	<b>1,00</b>	0,001984111
ENSDARG00000073918	<i>rnf41l</i>	37,19	<b>1,00</b>	0,005872089
ENSDARG00000011466	<i>lace1a</i>	121,94	<b>1,00</b>	3,96E-05

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000017834	<i>micall2b</i>	836,66	-1,00	2,01E-15
ENSDARG00000077589	<i>si:dkey-188c14.4</i>	38,78	-1,00	0,004224715
ENSDARG00000095819	<i>AMER3</i>	83,27	-1,00	0,000846033
ENSDARG00000051730	<i>slc7a10b</i>	439,03	-1,00	1,36E-10
ENSDARG00000022841	<i>ptk2ba</i>	62,11	-1,00	0,001367981
ENSDARG00000034988	<i>asb4</i>	117,38	-1,00	0,00015264
ENSDARG00000046107	<i>CASKIN1 (2 of 2)</i>	2596,48	-1,01	2,76E-19
ENSDARG00000044532	<i>nr4a2b</i>	265,44	-1,01	4,66E-07
ENSDARG00000018534	<i>slc6a9</i>	7299,24	-1,01	1,55E-29
ENSDARG00000071622	<i>CABZ01046433.1</i>	40,40	-1,01	0,003645754
ENSDARG00000062108	<i>iffo1b</i>	355,02	-1,01	1,86E-09
ENSDARG00000020884	<i>gli2b</i>	4707,77	-1,02	1,49E-28
ENSDARG00000069595	<i>si:ch211-214c7.4</i>	5972,01	-1,02	1,36E-22
ENSDARG00000075378	<i>NIPBL (2 of 3)</i>	1898,64	-1,02	1,91E-23
ENSDARG00000068369	<i>angptl2b</i>	1758,50	-1,02	3,99E-21
ENSDARG00000016132	<i>keap1a</i>	222,86	-1,02	1,07E-06
ENSDARG00000036102	<i>ctdsp2</i>	4511,93	-1,02	3,95E-23
ENSDARG00000002510	<i>dmbx1b</i>	231,04	-1,02	5,25E-07
ENSDARG00000034043	<i>irx5a</i>	1519,94	-1,03	3,14E-21
ENSDARG00000070565	<i>ADAP2</i>	216,08	-1,03	2,94E-06
ENSDARG00000033852	<i>mad11l</i>	1436,49	-1,03	5,44E-16
ENSDARG00000095282	<i>si:ch211-15o14.2</i>	12,81	-1,03	0,005820653
ENSDARG00000075942	<i>FRMD5 (1 of 2)</i>	153,86	-1,03	1,13E-05
ENSDARG00000082979	<i>CABZ01028287.1</i>	597,30	-1,03	1,68E-13
ENSDARG00000044670	<i>ITGAL</i>	1005,72	-1,03	1,85E-09
ENSDARG00000073957	<i>tox3</i>	2572,04	-1,03	1,03E-16
ENSDARG00000007220	<i>ncam1b</i>	4147,22	-1,03	9,54E-22
ENSDARG00000015876	<i>npas3b</i>	1019,11	-1,03	2,68E-11
ENSDARG00000033140	<i>desi1a</i>	161,26	-1,03	1,47E-05
ENSDARG00000043993	<i>KCNIP2 (1 of 2)</i>	91,87	-1,04	0,000197652
ENSDARG00000019932	<i>slc5a11</i>	15,11	-1,04	0,005836008
ENSDARG00000036912	<i>edn1</i>	81,38	-1,04	0,000307154
ENSDARG00000053572	ENSDARG00000053572	362,14	-1,04	3,70E-09
ENSDARG00000071487	<i>C21H18orf54</i>	324,91	-1,04	7,47E-09
ENSDARG00000032705	<i>foxg1b</i>	85,78	-1,04	0,000469018
ENSDARG00000062821	<i>slc6a15</i>	89,15	-1,04	0,000260593
ENSDARG00000044671	<i>wfikkn1</i>	585,06	-1,04	3,60E-09
ENSDARG00000095981	<i>SSC5D (4 of 9)</i>	40,77	-1,04	0,002976364
ENSDARG00000057013	<i>cadm3</i>	1046,55	-1,04	9,08E-13
ENSDARG00000077471	<i>hmces</i>	185,09	-1,04	2,12E-06
ENSDARG00000011298	<i>atf7a</i>	937,47	-1,04	9,61E-18
ENSDARG00000078966	<i>rbm15b</i>	3539,31	-1,05	6,43E-20
ENSDARG00000088899	<i>ralgapb</i>	2220,62	-1,05	1,53E-20
ENSDARG00000063447	<i>KLHL28</i>	225,52	-1,05	2,73E-07
ENSDARG00000078817	<i>rnf165b</i>	670,28	-1,05	1,65E-12
ENSDARG00000063719	<i>usp8</i>	1974,00	-1,05	9,58E-25
ENSDARG00000038386	<i>ascl1a</i>	424,63	-1,05	2,88E-08
ENSDARG00000079233	<i>E2F2</i>	2108,86	-1,05	2,45E-14

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000086705	<i>PROB1</i>	158,36	-1,05	6,87E-06
ENSDARG00000094488	<i>si:ch211-214j8.15</i>	318,89	-1,05	7,12E-08
ENSDARG00000035023	<i>kiaa0907</i>	1598,86	-1,05	1,56E-15
ENSDARG00000016116	<i>ebf1a</i>	552,88	-1,05	3,18E-10
ENSDARG00000032111	<i>MTFP1</i>	42,45	-1,05	0,002268344
ENSDARG00000074441	<i>gp1bb</i>	85,23	-1,06	0,000160017
ENSDARG00000075139	<i>hdac5</i>	324,38	-1,06	8,51E-09
ENSDARG00000092799	<i>camta2</i>	57,29	-1,06	0,000987545
ENSDARG00000001873	<i>phgdh</i>	8185,46	-1,06	3,34E-19
ENSDARG00000044251	<i>rasgef1bb</i>	4443,51	-1,06	3,46E-16
ENSDARG00000059801	<i>pdzd2</i>	1727,25	-1,06	1,16E-21
ENSDARG00000076528	<i>CR538726.1</i>	629,48	-1,06	2,61E-14
ENSDARG00000079727	<i>sepp1b</i>	62,23	-1,07	0,000743982
ENSDARG00000055439	<i>adamts17</i>	43,71	-1,07	0,001767734
ENSDARG00000058284	<i>CT990561.1</i>	407,70	-1,07	3,93E-10
ENSDARG00000076657	<i>plagl2</i>	710,20	-1,07	7,49E-15
ENSDARG00000030498	<i>il6st</i>	11274,76	-1,07	2,59E-22
ENSDARG00000097368	<i>si:dkey-244a7.1</i>	135,10	-1,07	3,91E-05
ENSDARG00000062558	<i>rspry1</i>	4934,76	-1,07	3,09E-21
ENSDARG00000037260	<i>toporsa</i>	608,15	-1,07	5,92E-13
ENSDARG00000070396	<i>serpinb1l2</i>	188,83	-1,07	1,22E-06
ENSDARG00000009702	<i>ascl1b</i>	343,32	-1,07	6,00E-10
ENSDARG00000033029	<i>pkd1b</i>	4789,18	-1,08	0,000361201
ENSDARG00000087225	<i>CU856681.1</i>	366,25	-1,08	4,78E-08
ENSDARG00000096565	<i>si:dkey-45e15.9</i>	19,56	-1,08	0,004080523
ENSDARG00000001767	<i>slc29a2</i>	1490,14	-1,08	8,51E-16
ENSDARG00000000906	<i>skap2</i>	61,70	-1,08	0,000555637
ENSDARG00000079438	<i>PKP3 (2 of 2)</i>	428,12	-1,09	1,85E-10
ENSDARG00000061896	<i>slco2a1</i>	60,55	-1,09	0,000695652
ENSDARG00000077737	<i>spsb3a</i>	872,69	-1,09	6,43E-18
ENSDARG00000078687	<i>SECISBP2L</i>	344,20	-1,09	1,32E-10
ENSDARG00000016908	<i>zgc:171779</i>	41,22	-1,09	0,001406654
ENSDARG00000060207	<i>traf7</i>	2700,73	-1,10	2,32E-21
ENSDARG00000062220	<i>plekha7b</i>	1016,76	-1,10	4,18E-18
ENSDARG00000018162	<i>ctnnal1</i>	650,63	-1,10	3,07E-14
ENSDARG00000093833	<i>si:ch73-382f3.1</i>	271,09	-1,10	3,40E-09
ENSDARG00000007275	<i>si:ch211-251b21.1</i>	985,32	-1,10	2,26E-17
ENSDARG00000088884	<i>CABZ01088930.1</i>	2448,35	-1,10	5,03E-24
ENSDARG00000067825	<i>si:ch1073-459b3.2</i>	218,61	-1,11	4,54E-08
ENSDARG00000070141	<i>si:ch211-191i18.2</i>	123,12	-1,11	1,61E-05
ENSDARG00000035907	<i>fam49a</i>	1390,81	-1,11	2,09E-20
ENSDARG00000044796	ENSDARG00000044796	578,02	-1,11	2,63E-15
ENSDARG00000089046	<i>MTMR3 (2 of 3)</i>	363,66	-1,11	2,36E-11
ENSDARG00000074319	<i>sall1a</i>	4128,41	-1,12	7,14E-26
ENSDARG00000059097	<i>nktr</i>	3818,58	-1,12	3,42E-34
ENSDARG00000063691	<i>CABZ01088927.1</i>	709,74	-1,12	1,98E-15
ENSDARG00000090480	<i>CR854855.2</i>	33,90	-1,12	0,001706659
ENSDARG00000045886	<i>slc38a2</i>	11418,76	-1,12	1,24E-26



Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000043904	<i>pnrc1</i>	34,90	-1,12	0,001499041
ENSDARG00000093182	<i>EIF2AK1</i>	733,33	-1,12	7,28E-15
ENSDARG00000024537	<i>emilin1a</i>	514,79	-1,13	1,25E-11
ENSDARG00000016981	<i>bcar3</i>	1158,66	-1,13	6,29E-18
ENSDARG00000038159	<i>tcf7l1a</i>	4559,56	-1,13	1,66E-25
ENSDARG00000039510	<i>dbx2</i>	400,40	-1,13	7,72E-12
ENSDARG00000043011	<i>chst14</i>	340,48	-1,13	2,82E-11
ENSDARG00000054031	<i>MXD4</i>	62,46	-1,13	0,00036202
ENSDARG00000016363	<i>her8a</i>	9625,44	-1,14	1,64E-23
ENSDARG00000038025	<i>cbx7a</i>	6769,05	-1,14	4,12E-20
ENSDARG00000001910	<i>rorab</i>	557,70	-1,14	2,29E-09
ENSDARG00000045914	<i>si:ch211-51e12.7</i>	8452,39	-1,14	1,53E-30
ENSDARG00000011190	<i>fgfr1b</i>	6415,15	-1,15	7,57E-31
ENSDARG00000009510	<i>irx1a</i>	1949,90	-1,15	4,00E-16
ENSDARG00000089435	<i>si:dkey-283b15.3</i>	9364,97	-1,15	7,98E-32
ENSDARG00000015970	<i>phip</i>	5164,73	-1,15	4,58E-24
ENSDARG00000058440	<i>slc6a6b</i>	181,19	-1,15	1,44E-06
ENSDARG00000023217	<i>crema</i>	15371,28	-1,15	4,56E-37
ENSDARG00000043250	<i>ppm1ab</i>	1151,44	-1,15	5,57E-23
ENSDARG00000070052	<i>tldr6</i>	96,43	-1,15	1,97E-05
ENSDARG00000035521	<i>sfrp1a</i>	1676,71	-1,15	3,23E-22
ENSDARG00000041110	<i>dnajc3</i>	1112,62	-1,16	1,08E-21
ENSDARG00000078389	<i>si:dkey-188i13.7</i>	20,84	-1,17	0,001719377
ENSDARG00000069402	<i>lrrc4.1</i>	934,85	-1,17	9,45E-20
ENSDARG00000035899	<i>lingo1b</i>	140,31	-1,17	1,22E-06
ENSDARG00000068280	<i>CABZ01083696.1</i>	367,71	-1,17	1,05E-11
ENSDARG00000061810	ENSDARG00000061810	42,22	-1,18	0,00054127
ENSDARG00000056250	<i>add3b</i>	112,88	-1,18	7,74E-06
ENSDARG00000077785	<i>atf5b</i>	576,99	-1,18	6,22E-17
ENSDARG00000044521	<i>eef1b2</i>	17344,24	-1,18	7,34E-23
ENSDARG00000092644	<i>AGO1</i>	5851,09	-1,18	6,80E-34
ENSDARG00000042010	<i>CABZ01066502.1</i>	67,92	-1,19	0,00014186
ENSDARG00000053650	<i>foxb1b</i>	259,78	-1,19	4,37E-09
ENSDARG00000052713	<i>lrrtm1</i>	939,28	-1,19	8,84E-12
ENSDARG00000061368	<i>klf13</i>	843,13	-1,19	2,83E-21
ENSDARG00000086927	<i>pik3c2b</i>	6939,47	-1,19	4,51E-35
ENSDARG00000008100	<i>slc7a10a</i>	34,58	-1,19	0,000659364
ENSDARG00000036090	<i>pard6gb</i>	3913,75	-1,19	3,45E-38
ENSDARG00000097706	<i>si:dkey-11a7.3</i>	119,35	-1,19	3,12E-06
ENSDARG00000090353	<i>CR848788.1</i>	2770,02	-1,19	1,52E-30
ENSDARG00000093015	<i>si:ch211-174j14.2</i>	481,17	-1,19	6,66E-13
ENSDARG00000052642	<i>shisa9b</i>	27,61	-1,20	0,001025366
ENSDARG00000054537	<i>nhs1a</i>	279,32	-1,20	9,04E-08
ENSDARG00000060587	<i>baiap2b</i>	157,33	-1,20	3,56E-07
ENSDARG00000094556	<i>si:dkey-24h22.5</i>	105,37	-1,21	3,81E-06
ENSDARG00000037422	<i>SLC6A16 (2 of 2)</i>	2814,35	-1,21	1,15E-28
ENSDARG00000057513	<i>mdm4</i>	3288,81	-1,21	1,50E-30
ENSDARG00000036073	<i>cebpg</i>	6784,57	-1,21	6,89E-39

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000038141	<i>atf4b2</i>	25458,62	<b>-1,22</b>	3,62E-40
ENSDARG00000035598	<i>coro1ca</i>	4261,96	<b>-1,22</b>	2,78E-41
ENSDARG00000056561	<i>asb11</i>	121,83	<b>-1,23</b>	1,18E-06
ENSDARG00000056680	<i>stc2a</i>	191,66	<b>-1,23</b>	2,90E-08
ENSDARG00000096454	<i>ap1m2</i>	29,01	<b>-1,23</b>	0,000755522
ENSDARG00000086931	<i>CABZ01029822.1</i>	1115,54	<b>-1,23</b>	1,32E-14
ENSDARG00000045403	<i>CABZ01090951.1</i>	76,94	<b>-1,23</b>	3,10E-05
ENSDARG00000078006	<i>WSCD1 (2 of 3)</i>	75,74	<b>-1,24</b>	4,32E-05
ENSDARG00000061564	<i>nlrc3</i>	270,88	<b>-1,24</b>	9,32E-11
ENSDARG00000045921	ENSDARG00000045921	700,69	<b>-1,24</b>	1,17E-18
ENSDARG00000044619	<i>birc2</i>	2555,32	<b>-1,24</b>	9,67E-30
ENSDARG00000004161	<i>ik</i>	3170,33	<b>-1,24</b>	5,69E-27
ENSDARG00000091111	<i>TIFA</i>	660,44	<b>-1,24</b>	1,89E-19
ENSDARG00000016733	<i>psat1</i>	5524,46	<b>-1,25</b>	6,70E-37
ENSDARG00000076927	<i>DUSP27</i>	305,58	<b>-1,25</b>	4,78E-08
ENSDARG00000045851	<i>GALNT8 (3 of 5)</i>	36,56	<b>-1,25</b>	0,000315791
ENSDARG00000097992	<i>si:ch211-150o23.4</i>	108,08	<b>-1,25</b>	1,56E-06
ENSDARG00000070220	<i>pou3f2a</i>	1902,76	<b>-1,26</b>	2,10E-22
ENSDARG00000006272	<i>mpp5a</i>	6477,78	<b>-1,26</b>	1,97E-35
ENSDARG00000057729	ENSDARG00000057729	132,68	<b>-1,26</b>	3,05E-06
ENSDARG00000076268	<i>C5H9orf172 (1 of 2)</i>	70,79	<b>-1,26</b>	3,02E-05
ENSDARG00000075157	<i>bicc2</i>	160,24	<b>-1,26</b>	1,38E-07
ENSDARG00000067607	<i>sreb1</i>	1531,64	<b>-1,27</b>	1,54E-28
ENSDARG00000026799	<i>suv39h1a</i>	42,45	<b>-1,27</b>	0,000238384
ENSDARG00000088054	<i>CABZ01086926.1</i>	64,11	<b>-1,28</b>	4,10E-05
ENSDARG00000038139	<i>PDGFB (1 of 3)</i>	1125,59	<b>-1,29</b>	4,10E-20
ENSDARG00000009351	<i>fgf6a</i>	54,74	<b>-1,29</b>	7,05E-05
ENSDARG00000076103	<i>grid2ipa</i>	75,30	<b>-1,29</b>	1,07E-05
ENSDARG00000057644	<i>adam8b</i>	616,69	<b>-1,29</b>	1,39E-13
ENSDARG00000070903	<i>met</i>	915,70	<b>-1,30</b>	7,84E-18
ENSDARG00000060946	<i>pip5k1</i>	98,40	<b>-1,30</b>	2,43E-06
ENSDARG00000013240	<i>zgc:172271</i>	32,19	<b>-1,30</b>	0,00028332
ENSDARG00000041425	<i>CU862021.1</i>	206,74	<b>-1,30</b>	1,93E-09
ENSDARG00000056400	<i>helt</i>	152,80	<b>-1,30</b>	8,27E-07
ENSDARG00000077566	<i>CZv9_NA991H1orf52</i>	822,84	<b>-1,30</b>	7,28E-22
ENSDARG00000077310	<i>gpr144</i>	3316,37	<b>-1,30</b>	1,25E-22
ENSDARG00000059406	<i>raf1b</i>	820,46	<b>-1,31</b>	3,66E-25
ENSDARG00000076184	<i>SAMD8</i>	39,14	<b>-1,32</b>	0,000118022
ENSDARG00000020625	<i>jak1</i>	6831,35	<b>-1,33</b>	1,77E-22
ENSDARG00000090224	<i>CABZ01056375.1</i>	53,20	<b>-1,34</b>	5,54E-05
ENSDARG00000077161	<i>ccdc153</i>	57,49	<b>-1,34</b>	2,22E-05
ENSDARG00000039987	<i>hivep2a</i>	1385,92	<b>-1,35</b>	4,86E-23
ENSDARG00000089942	<i>BX000348.1</i>	282,94	<b>-1,35</b>	1,93E-11
ENSDARG00000075480	<i>si:dkey-63d15.12</i>	37,00	<b>-1,36</b>	9,09E-05
ENSDARG00000035308	<i>grb10b</i>	525,03	<b>-1,36</b>	4,90E-18
ENSDARG00000086990	<i>LRRC16B</i>	117,36	<b>-1,36</b>	7,69E-08
ENSDARG00000056130	<i>neurog1</i>	549,83	<b>-1,36</b>	2,23E-18
ENSDARG00000059950	<i>ZPLXDC2</i>	3320,35	<b>-1,36</b>	5,40E-40

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000053301	<i>insm1b</i>	909,35	<b>-1,37</b>	1,40E-16
ENSDARG00000001676	<i>gpm6bb</i>	7884,60	<b>-1,37</b>	7,07E-48
ENSDARG00000078016	<i>DTX4 (2 of 2)</i>	2003,39	<b>-1,38</b>	4,31E-37
ENSDARG00000058678	<i>aqp10b</i>	39,02	<b>-1,39</b>	6,58E-05
ENSDARG00000011998	<i>bfsp2</i>	50,69	<b>-1,39</b>	3,32E-05
ENSDARG00000076557	<i>bicc2</i>	489,15	<b>-1,39</b>	2,71E-15
ENSDARG00000015610	<i>tubg1</i>	2259,85	<b>-1,40</b>	3,49E-32
ENSDARG00000062030	<i>GPR17</i>	367,21	<b>-1,41</b>	2,64E-17
ENSDARG00000068214	<i>ccni</i>	3612,14	<b>-1,41</b>	2,86E-31
ENSDARG00000010244	<i>rpl22l1</i>	6556,42	<b>-1,41</b>	3,31E-28
ENSDARG00000008540	<i>sox21b</i>	1944,08	<b>-1,41</b>	4,01E-27
ENSDARG00000052515	<i>calcoco2</i>	130,38	<b>-1,43</b>	3,42E-09
ENSDARG00000059888	ENSDARG00000059888	370,72	<b>-1,45</b>	3,56E-17
ENSDARG00000055959	<i>CABZ01090980.1</i>	56,55	<b>-1,45</b>	6,52E-06
ENSDARG00000068008	<i>arhgap44</i>	65,01	<b>-1,46</b>	3,98E-06
ENSDARG00000010946	<i>cbsb</i>	4007,71	<b>-1,47</b>	1,42E-36
ENSDARG00000043046	<i>fbxl5</i>	1213,08	<b>-1,47</b>	1,69E-27
ENSDARG00000015065	<i>c4</i>	27,98	<b>-1,49</b>	3,05E-05
ENSDARG00000012199	<i>gpt2</i>	2060,85	<b>-1,50</b>	3,47E-41
ENSDARG00000041203	<i>drap1</i>	4251,00	<b>-1,50</b>	7,79E-34
ENSDARG00000030530	<i>slc22a2</i>	99,83	<b>-1,50</b>	1,56E-08
ENSDARG00000075230	<i>tet1</i>	1441,75	<b>-1,50</b>	1,84E-28
ENSDARG00000057352	<i>slc25a29</i>	350,03	<b>-1,50</b>	2,30E-16
ENSDARG00000033544	<i>adamts15b</i>	188,06	<b>-1,51</b>	5,90E-11
ENSDARG00000059879	<i>rptor</i>	876,17	<b>-1,51</b>	1,18E-33
ENSDARG00000018149	<i>slc38a4</i>	8303,81	<b>-1,51</b>	1,03E-32
ENSDARG00000055162	<i>zhx2</i>	2342,00	<b>-1,52</b>	2,63E-31
ENSDARG00000069619	<i>atf7ip</i>	15957,23	<b>-1,52</b>	3,77E-39
ENSDARG00000077864	<i>rasgrp3</i>	616,55	<b>-1,52</b>	8,07E-16
ENSDARG00000016773	<i>cishb</i>	219,54	<b>-1,52</b>	5,71E-12
ENSDARG00000010655	<i>ppm1k</i>	1696,98	<b>-1,53</b>	5,17E-38
ENSDARG00000054332	<i>trim66</i>	99,76	<b>-1,54</b>	6,39E-09
ENSDARG00000044441	<i>MYO7B (1 of 2)</i>	89,81	<b>-1,55</b>	1,95E-08
ENSDARG00000053262	<i>atp1b4</i>	2079,61	<b>-1,56</b>	8,01E-42
ENSDARG00000015915	<i>slc25a36b</i>	807,52	<b>-1,59</b>	3,77E-33
ENSDARG00000055455	<i>gpm6aa</i>	7238,23	<b>-1,59</b>	1,10E-36
ENSDARG00000052775	<i>opn3</i>	53,81	<b>-1,59</b>	5,30E-07
ENSDARG00000041776	<i>ndst3</i>	2585,81	<b>-1,61</b>	2,86E-36
ENSDARG00000055562	<i>mtpn</i>	1575,19	<b>-1,64</b>	1,65E-49
ENSDARG00000090706	<i>slc1a5</i>	282,82	<b>-1,64</b>	3,02E-17
ENSDARG00000011533	<i>sema6dl</i>	7734,13	<b>-1,64</b>	2,50E-42
ENSDARG00000016200	<i>trib3</i>	4247,30	<b>-1,65</b>	1,23E-10
ENSDARG00000080675	<i>si:dkey-71b5.7</i>	459,93	<b>-1,65</b>	2,29E-24
ENSDARG00000016465	<i>slc1a5</i>	240,56	<b>-1,66</b>	6,83E-18
ENSDARG00000062855	<i>plekhg7</i>	1517,09	<b>-1,67</b>	2,09E-45
ENSDARG00000089368	<i>hopx</i>	1451,18	<b>-1,67</b>	1,76E-27
ENSDARG00000075864	<i>igsf9a</i>	4965,82	<b>-1,68</b>	6,09E-79
ENSDARG00000027824	<i>top1mt</i>	71,94	<b>-1,68</b>	1,94E-08

Ensembl Gene ID	Gene Name	Base Mean	Log2FC Fold Change	p.value
ENSDARG00000022712	<i>stat3</i>	5603,05	<b>-1,68</b>	3,74E-51
ENSDARG00000037012	<i>slc3a2b</i>	3263,18	<b>-1,69</b>	9,08E-45
ENSDARG00000021896	<i>asap3</i>	1373,10	<b>-1,70</b>	6,86E-28
ENSDARG00000063583	<i>map2k4a</i>	341,44	<b>-1,72</b>	3,34E-22
ENSDARG00000036096	<i>smad3a</i>	535,18	<b>-1,72</b>	1,76E-20
ENSDARG00000000380	<i>pde6a</i>	123,28	<b>-1,72</b>	5,79E-12
ENSDARG00000079528	<i>hivep1</i>	1458,46	<b>-1,74</b>	7,51E-42
ENSDARG00000086650	<i>si:dkeyp-27e10.6</i>	81,64	<b>-1,74</b>	8,92E-10
ENSDARG00000056739	<i>tas1r1</i>	104,78	<b>-1,75</b>	3,56E-11
ENSDARG00000001785	<i>irx2a</i>	381,52	<b>-1,77</b>	1,41E-19
ENSDARG00000057125	<i>pld1b</i>	227,75	<b>-1,78</b>	4,72E-16
ENSDARG00000059236	<i>ptger4a</i>	110,22	<b>-1,86</b>	9,32E-13
ENSDARG00000016725	<i>GADD45G (1 of 3)</i>	1857,33	<b>-1,92</b>	9,55E-41
ENSDARG00000020876	<i>PDK2 (1 of 2)</i>	1317,01	<b>-1,95</b>	3,61E-46
ENSDARG00000019553	<i>pnp5b</i>	393,70	<b>-1,98</b>	2,42E-32
ENSDARG00000020645	<i>slc7a3a</i>	8314,97	<b>-1,98</b>	1,44E-87
ENSDARG00000044676	<i>GADD45G (3 of 3)</i>	566,97	<b>-1,98</b>	4,00E-31
ENSDARG00000039269	<i>arg2</i>	153,64	<b>-2,01</b>	6,53E-19
ENSDARG00000070012	<i>sesn2</i>	585,57	<b>-2,02</b>	7,74E-40
ENSDARG00000078671	<i>cdk5r2b</i>	81,66	<b>-2,08</b>	2,38E-13
ENSDARG00000040407	<i>usp22</i>	558,53	<b>-2,08</b>	4,03E-43
ENSDARG00000078283	<i>LRRC8E</i>	360,48	<b>-2,12</b>	7,35E-29
ENSDARG00000014947	<i>igfbp1a</i>	1066,16	<b>-2,19</b>	2,62E-45
ENSDARG00000070426	<i>chac1</i>	10317,28	<b>-2,21</b>	2,02E-69
ENSDARG00000094316	<i>si:rp71-80o10.4</i>	90,49	<b>-2,23</b>	7,70E-16
ENSDARG00000059923	<i>slc25a47a</i>	103,80	<b>-2,29</b>	1,33E-17
ENSDARG00000074634	<i>keap1b</i>	1447,69	<b>-3,29</b>	2,16E-149