

Université de Montréal

Rôles des facteurs de transcriptions SIM1, OTP et POU3F2 dans le développement de
l'hypothalamus antérieur.

Par

Sandrine St-Onge

Département des neurosciences

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de la maîtrise
en neurosciences

Avril 2021

© Sandrine St-Onge, 2021

Université de Montréal

Unité académique : département/école/institut (s'il y a lieu), Faculté / École

Ce mémoire (ou cette thèse) intitulé(e)

Titre du mémoire ou de la thèse

Sous-titre du mémoire ou de la thèse (le cas échéant)

Présenté par

Sandrine St-Onge

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Sophie Tremblay

Président-rapporteur

Jacques L. Michaud

Directeur de recherche

Stéphane Roy

Membre du jury

Résumé (Français)

Les facteurs de transcription SIM1, OTP, POU3F2 et ARNT2 interagissent ensemble en orchestrant le développement complexe de l'hypothalamus, une région du cerveau contenant plusieurs petites populations circonscrites de neurones, dont le noyau paraventriculaire (PVN). Ce noyau est un important centre intégrateur et l'haploinsuffisance du facteur de transcription Sim1, essentiel au développement du PVN, mène à l'hyperphagie autant chez la souris que l'homme. Différentes souris ont été générées par génie génétique afin de nous aider à trouver d'autres gènes essentiels qui participent à cette cascade transcriptionnelle.

Premièrement, la partie antérieure de l'hypothalamus a été récoltée chez des embryons (E12.5) de souris qui surexprimaient le gène *Pou3f2* sous le promoteur de *Otp7*. L'analyse transcriptionnelle de cette partie a été comparée avec les embryons (E12.5) wt de la même portée, de sorte qu'il a été possible de constater que différents gènes ont été régulés à la hausse et d'autres à la baisse. Les gènes en question ont été choisis selon leur pertinence au développement de la région d'intérêt, l'hypothalamus, et de trois autres critères : un accroissement de plus de 1.5, une expression minimale dans l'embryon d'au moins 1000 lectures et le rang le plus haut. Cette méthode discriminatoire a permis d'identifier les gènes les plus affectés dont *Lgi2*, *Fezf2*, *Sema3c*, *Six6*, *Sox14*, *Lmo4*, *Nwd2* et *Nkx2.1*. Les gènes régulés à la baisse étaient *Six6*, *Sox14* et *Nkx2.1*, tandis que tous les autres étaient à la hausse. Afin de confirmer les résultats obtenus, une validation par hybridation in situ a été utilisée sur des tranches d'hypothalamus d'embryons E12.5. Nous avons pu confirmer la surexpression des marqueurs *Lgi2*, *Fezf2*, *Sema3c*, *Lmo4* et de *Pou3f2* dans le domaine du PVN. La diminution de l'expression des marqueurs *Sox14* et *Nkx2.1* a pu être détectée dans le domaine basal de l'hypothalamus, ce qui suggère que l'effet d'une surexpression de *Pou3f2* dans le domaine du PVN ait un effet cellulaire non autonome. La diminution de l'expression de *Six6* dans le domaine basal n'a pas pu être confirmée de façon reproductible.

Deuxièmement, il semblerait qu'il y ait une redondance de rôle entre les facteurs de transcription *Otp* et *Sim1*, tous les deux agissant en amont de *Pou3f2*. Afin de comparer leur impact dans le programme transcriptionnel, la technologie CrisPR-cas9 a été utilisée pour faire un KO du 2^e exon d'*Otp*. Nous avons pu confirmer notre modèle de mutation en le comparant aux autres mutants de la littérature par une réduction de l'expression d'OT, d'OTP, d'AVP et de TRH.

Troisièmement, les souris hétérozygotes pour *Otp* et *Sim1* seront croisées, de sorte d'obtenir quatre génotypes : wt, *Otp*^{+/-}, *Sim1*^{+/tlz+} et *Otp*^{+/-}*Sim1*^{+/tlz+}. Puisqu'une redondance des rôles de *Sim1* et *Otp* est soupçonnée, le phénotype du double mutant devrait présenter une obésité par hyperphagie plus importante que celle des souris hétérozygotes pour le gène *Sim1* ou *Otp*. Les souris sont pesées à partir de la 5^e semaine de vie jusqu'à l'âge de 6 mois à une fréquence d'une fois par semaine. L'apport calorique est également mesuré une fois par semaine sur période de 24h. La double mutation (*Otp*^{+/-}*Sim1*^{+/tlz+}) chez les souris mâles causait un phénotype d'obésité plus important que la singularité des mutations, mais ce n'était pas le cas chez les souris femelles. Les souris portant la mutation d'*Otp* étaient tout de même plus obèses que les souris sauvages pour les deux sexes. Plus de souris seront nécessaire pour déterminer si un apport calorique sans changement au niveau des dépenses énergétiques est la cause de ce gain pondéral.

Mots clés : facteurs de transcription, *Sim1*, *Otp*, *Pou3f2*, hypothalamus, noyau paraventriculaire (PVN), hyperphagie, cascade transcriptionnelle, hybridation in situ, promoteur, embryon de souris, développement.

Résumé (Anglais)

The transcription factors SIM1, OTP and POU3F2 interact together to orchestrate the complex development of the hypothalamus, a region of the brain containing several small, circumscribed populations of neurons, including the paraventricular nucleus (PVN). This nucleus is an important integrating center, and the haploinsufficiency of the transcription factor *Sim1*, essential for the development of PVN, leads to overeating in both mice and humans. Different mice have been genetically engineered to help us find other essential genes that participate in this transcriptional cascade.

Firstly, the anterior part of the hypothalamus was collected from mice embryos (E12.5) which overexpressed the *Pou3f2* gene under the OTP7 promoter. The transcriptional analysis was compared to wt embryos from the same litter to see the different upregulated and downregulated genes. These genes were chosen according to their relevance to the development of the anterior hypothalamus. Three criteria were used to discriminate genes from one another: 1) an increase of more than 1.5, 2) a minimal expression in the embryo (E12.5) of at least 1000 reads and 3) the highest rank. This discriminatory method allowed us to identify the genes *Lgi2*, *Fezf2*, *Sema3c*, *Six6*, *Sox14*, *Lmo4*, *Nwd2*, *Nkx2.1*. To have a visuospatial idea of these affected genes, the validation of these results was done by in situ hybridization on E12.5 embryo hypothalamus. We have been able to see an overexpression in the PVN domain for the *Lgi2*, *Fezf2*, *Sema3c*, *Lmo4* and *Pou3f2* markers. The reduction of expression for *Sox14* and *Nkx2.1* markers were visible in the basal domain of the hypothalamus, which suggest a non cell autonomous effect of *Pou3f2* being overexpressed. The reduction of *Six6* couldn't be consistently visible with repetition.

Secondly, a redundant role of OTP and SIM1 seems to occur in the development of the hypothalamus. We created a KO line of the *Otp* gene by deleting the second exon with CrispR-cas9 and characterized it. We then compared it to the *Sim1*^{+/*tlz*+} line that we already generated in the lab. We were able to confirm our mutation model by seeing a reduction in the expression of crucial markers such as OT, OTP, AVP and TRH.

Thirdly, we crossed *Otp*^{+/*-*} with *Sim1*^{+/*tlz*+} mice to obtain four different genotypes: wt, *Otp*^{+/*-*}, *Sim1*^{+/*tlz*+} and *Otp*^{+/*-*} *Sim1*^{+/*tlz*+}. Since a redundant aspect has been observed for SIM1 and OTP transcription factors, we were wondering if the obesity phenotype would be worsened by carrying

both mutation or not. These mice were weighted every week from 5-week-old up to 6 months old. Food intake has also been measured since the obesity has been reported to be caused by hyperphagia in *Sim1* mutant mice. The male mice carrying the double mutation ($Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$) showed a more important weight gain than only $Sim1^{+/tlz+}$ or $Otp^{+/-}$ mutants, but it was not the case for the female mice. The mice carrying the *Otp* mutation still got a more important weight gain than the wt mice (females and males). More mice would be necessary to determine if this weight gain is caused by hyperphagia only or if unbalance energy cost is part of the cause.

Key words: transcription factors, *Sim1*, *Otp*, *Pou3f2*, hypothalamus, paraventricular nucleus (PVN), hyperphagia, transcriptional cascade, in situ hybridization, promotor, mouse embryos, development.

Table des matières

Résumé (Français).....	3
Résumé (Anglais).....	5
Table des matières.....	7
Liste des figures	10
Liste des sigles et abréviations	12
Remerciements	15
CHAPITRE 1 : Introduction générale.....	16
Le noyau paraventriculaire et l'hypothalamus	16
1.1 Organisation générale.....	16
1.1.1 Noyaux	17
1.2 Fonctions de l'hypothalamus.....	18
1.2.1 Reproduction et Croissance.....	18
1.2.2 Contrôle homéostasique	19
1.2.3 Métabolisme et prise alimentaire	20
1.2.4 Comportementales et cognitives	21
1.3 Fonction et structure du noyau paraventriculaire : neurones magnocellulaires	22
1.3.1 Les deux populations.....	22
1.3.2 Rôle de VP et OT hypophysaire.....	23
1.4 Fonction et structure du noyau paraventriculaire : les neurones parvocellulaires.....	24
1.4.1 Les principales populations.....	24
1.5 Induction et régionalisation de l'hypothalamus durant le développement.....	24
1.5.1 Développement des cellules progénitrices en neurones organisés en noyaux	26
1.5.2 Prolifération et différenciation des neurones du noyau paraventriculaire.....	28
1.5.2.1 Naissance des cellules modèle de neurogénèse « <i>outside-in</i> ».....	28
1.5.2.2 Différenciation	30
Régulation transcriptionnelle du développement du noyau paraventriculaire	31
1.5.3 Rôle de POU3f2/Brn2	31
1.5.3.1 Structure.....	31
1.5.3.2 Patron d'expression dans le cerveau adulte	31
1.5.3.3 Rôle dans le développement du PVN	31

1.5.4	Rôle de SIM1 et ARNT2.....	32
1.5.4.1	Structure.....	32
1.5.4.2	Patron d'expression.....	33
	Rôle dans le développement du PVN.....	33
1.5.5	Rôle d'OTP	34
1.5.5.1	Structure.....	34
1.5.5.2	Patron d'expression.....	34
1.6	Contrôle de l'équilibre énergétique par le noyau paraventriculaire	35
1.6.1	Circuits hypothalamiques impliqués dans le contrôle de l'équilibre énergétique....	35
1.7	Impact de l'haploinsuffisance de <i>SIM1</i> sur la prise alimentaire.....	37
1.7.1	4.2.1 Hyperphagie et obésité associée à l'haploinsuffisance de SIM1	37
1.7.1.1	Chez l'homme	37
1.7.1.2	Chez la souris	37
1.7.1.3	Rôle postnatal vs développemental.....	38
1.7.1.4	Mécanismes cellulaires sous-tendant le contrôle de la prise alimentaire par SIM1	38
1.7.2	Impact de l'haploinsuffisance de OTP, ARNT2 et POU3F2 sur l'équilibre énergétique.....	38
2	Hypothèses et buts	39
	CHAPITRE 2 Génération et caractérisation d'un nouvel allèle d' <i>Otp</i> Introduction	40
	Matériel et Méthodes	40
	Manipulation du gène <i>Otp</i> et <i>Sim1</i>	40
	Génotypage de l'allèle <i>Otp</i> ⁻	40
	Embryons de souris.....	42
	Clonage de sonde de souris.....	42
	Hybridation In Situ	43
	CHAPITRE 3 : Interactions entre les facteurs de transcription SIM1 et OTP.....	50
	Introduction	50
	Matériel et méthodes	50
	Animaux.....	50
	Pesée	50
	Analyse des masses.....	51
	Mesure de l'apport alimentaire	51

Résultats.....	58
CHAPITRE 4 : : Dissection du programme transcriptionnel induit par un gain de fonction de <i>Pou3f2</i>	63
Introduction	63
Matériel et méthodes	63
Animaux.....	63
Création de la lignée tg (Otp-Brn2)	64
Embryons de souris.....	64
Clonage de sonde de souris.....	64
Hybridation in situ	65
Résultats et discussion.....	65
Les gènes surexprimés	66
Les gènes dont l'expression est augmentée	66
Les gènes dont l'expression est diminuée.....	66
CHAPITRE 5 : Génération et caractérisation d'un nouvel allèle nul de <i>Pou3f2</i>	73
Introduction	73
Chapitre 6: Discussion	79
Otp et Sim1	79
POU3f2.....	81
Conclusion.....	82
Références	84
ANNEXE 1	90
ANNEXE 2	91

Liste des figures

Figure 1. Représentation des onze noyaux de l'hypothalamus d'un point de vue sagittal.....	17
Figure 2. Divisions des aires hypothalamiques et leurs noyaux.	22
Figure 3. Les différents types cellulaires qui composent le PVN et les autres noyaux dans la circuiterie vers l'hypophyse et d'autres structures extra hypothalamiques.....	23
Figure 4. Origines développementales des noyaux de l'hypothalamus.	26
Figure 5. Cascade transcriptionnelle et région prospectrice des noyaux de l'hypothalamus.	27
Figure 6. Les trois mécanismes de migration lors du développement des cellules progénitrices de l'hypothalamus.	28
Figure 7. Vue coronale d'un segment antérieur et postérieur de l'hypothalamus chez la souris E12.5.(Jacobowitz 1998).....	29
Figure 8. Fenêtre temporelle d'expression des facteurs de transcription dans l'hypothalamus antérieur des embryons de souris.	29
Figure 9. Cascade transcriptionnelles des différents facteurs menant aux cinq types cellulaires principaux qui composent l'hypothalamus antérieur.	30
Figure 10. Circuiterie hormonale et neuronale de la prise alimentaire. Les adipocytes sécrètent de la leptine lors de la prise alimentaire.....	36
Figure 11. Stratégie CRISPR-cas9 pour la création de la lignée OtpKO.....	41
Figure 12. Hybridation In Situ et immunofluorescence de l'hypothalamus avec les marqueurs Otp, Ot, Trh, SS et AVP chez les souris E18.5 sauvages et Otp ^{-/-}	46
Figure 13. Évolution de la masse des souris mâles.	51
Figure 14. Comparaison de la masse des souris mâles mutantes Otp ^{+/-} (vert) et Sim1 ^{+/tlz+} (rouge) aux souris sauvages (wt, noir).	52
Figure 15. Évolution de la masse des souris mâles mutantes Otp ^{+/-} Sim1 ^{+/tlz+} (turquoise) Otp ^{+/-} (vert) et Sim1 ^{+/tlz+} (rouge).....	53
Figure 16. Évolution de la masse des souris femelles wt, Otp ^{+/-} , Sim1 ^{+/tlz+}	54
Figure 17. Comparaison de la masse des souris femelles mutantes Otp ^{+/-} , Sim1 ^{+/tlz+} et Otp ^{+/-} Sim1 ^{+/tlz+} des souris sauvages.	55
Figure 18. Apport alimentaire des souris mâles wt, Sim1 ^{+/tlz+} et Otp ^{+/-} Sim1 ^{+/tlz+}	56
Figure 19. Apport alimentaire chez les souris femelles.	57
Figure 20. Souris transgénique exprimant Brn2/POU3f2 sous le promoteur d'Otp.....	64
Figure 21. Hybridation in situ des hypothalamus antérieur des marqueurs surexprimés chez la embryons transgénique tg(Otp7-Pou3f2).	68
Figure 22. Hybridation in situ des hypothalamus embryonnaires de la partie antérieure à la partie postérieure pour OTP et POU3F2.	69
Figure 23. Hybridation in situ des hypothalamus antérieur à postérieur d'embryon E12.5.	72
Figure 24. Stratégie CRISPR-cas9 pour la création de la lignée POU3F2KO.	74
Figure 25. Caractérisation du mutant POU3F2KO à E12.5.	75
Figure 26. Caractérisation par hybridation in situ et immunofluorescence de marqueurs de l'hypothalamus antérieur pour des embryons E18.5 Wt et POU3F2 ^{+/-}	76
Figure 27. Caractérisation de la lignée POU3F2 avec le marqueur d'AVP au niveau du cerveau embryonnaire E18.5.	77

Figure 28. Génération de la lignée mutante pour Otp avec la technologie CrispR-cas9.90
Figure 29. Génération de lignée mutante pour le gène Pou3f2/Brn2 à l'aide de la technologie
CrispR-cas9.91

Liste des sigles et abréviations

PVN : noyau paraventriculaire

3V : 3^{ième} ventricule

SCN : noyaux suprachiasmatiques

NPO : noyau pré optique

SON : noyau supraoptique

aHA : aire hypothalamique antérieure

VMN : noyau ventromédian

ARC : noyau arqué

LH : Noyau latéral de l'hypothalamus

DMV : noyau dorso médial de l'hypothalamus

aPH : aire postérieure de l'hypothalamus

CM : les corps mamillaires

aPV : noyau périventriculaire

GnRH : gonadotropin-releasing hormone

LH : hormones lutéinisantes

FSH : hormone folliculostimulante

ACTH : hormone adrénocorticotrope

AVP : vasopressine

Ot : ocytocine

GLUT-1 : transporteur de glucose de type I

TRH : l'hormone thyroïdienne

TSH : thyroïdostimuline

ACTH : hormone adrénocorticotrope

CRH : corticolibérine

NPY : neuropeptide Y

AgRP : *agouti-related peptide*

POMc : proopiomélanocortine

SNC : système nerveux central

GnRH : l'hormone de libération des gonadotrophines

Die Zeit zu schnell vergeht

aber

das Ende ist ein neuer Anfang.

Remerciements

Ce fut trois belles années remplies de bons souvenirs et je ne peux être que reconnaissante pour votre accueil chaleureux au sein de votre laboratoire, Dr. Michaud. J'aimerais vous remercier de m'avoir épaulée durant cette maîtrise et de votre aide lors de nos multiples dissections matinales sans nos doses de caféine quotidiennes. Christina, merci pour ta douceur et pour m'avoir appris tellement, autant au niveau scientifique que moral. Tu es une personne en or et je m'ennuierais des nombreux moments où nos épaules se sont soulevées sous nos sarraus. Marc, je te dois un énorme merci pour ton support au niveau technique, mais aussi pour tes leçons de japonais et tes cours culinaires (j'en avais bien besoin!). Nicolas, merci d'avoir été le premier contact avec ce laboratoire et pour tous tes conseils, sans parler des nombreux fous rires. Je ne serai jamais assez reconnaissante d'avoir fait la connaissance de vous trois, Claudie, Devanshi et Eve. Je me considère extrêmement chanceuse de vous avoir côtoyées et d'avoir construit avec vous cette chimie unique. Vous avez rendu mon quotidien léger et serein, sans parler de votre support constant. Vous avez été beaucoup plus que des collègues de travail et ça le restera. James, merci pour ton travail acharné et pour avoir fait équipe avec moi dans tous ces renouvellements de protocoles. Cindy, merci de m'avoir épaulée pendant ton stage dans les étapes finales de cette maîtrise. Cette expérience n'aurait pas pu être aussi enrichissante qu'en côtoyant les membres d'autres laboratoires. Clara, je te remercie pour ta douceur incassable et pour tous ses fous rires. Vidya, merci pour ton optimisme, ta résilience et pour ta bonne humeur contagieuse. J'aimerais également remercier Jannic Boehm pour les leçons d'allemand et pour l'humour léger entourant nos échanges linguistiques. Marianne M., je vais m'ennuyer de nos discussions autour de nos cafés matinaux. Marie-Claude, merci pour tous tes conseils, et ce, à tous les niveaux.

J'aimerais spécialement dire merci à ma famille pour leur support moral constant tout au long de ces trois dernières années. Julien, merci pour tous les fous rires à en être pliée en deux et pour ton écoute. J'en suis très reconnaissante, spécialement durant cette pandémie. Je tiens à remercier mon cercle d'amis dont Marianne L, Félix, Anne-Sophie, Alexie, Thomas, Simon et Frédéric F. pour simplement avoir été présents. Les occasions se sont faites plus rares, mais d'autant plus précieuses.

CHAPITRE 1 : Introduction générale.

Le noyau paraventriculaire et l'hypothalamus

L'hypothalamus est responsable de la régulation de nombreux processus physiologiques essentiels à la survie, tels que le rythme circadien, la soif, l'appétit, les comportements maternels et la sécrétion d'hormones hypophysaires. Comme l'hypothalamus est une région riche de noyaux hétérogènes, une régulation très précise de son développement doit être orchestrée. Le noyau paraventriculaire (PVN) fait partie des noyaux particulièrement importants, puisqu'il est impliqué dans la régulation de plusieurs processus physiologiques, dont la régulation de l'apport alimentaire et de la pression artérielle (Swanson and Sawchenko 1983). Lorsqu'il fait défaut, il peut y avoir des déséquilibres importants dans l'homéostasie, ce qui peut mener à des pathologies telles que l'hypertension artérielle et l'obésité (Swanson and Sawchenko 1983, Michaud 2001, Guyenet 2006).

1.1 Organisation générale

D'un point de vue évolutif, l'hypothalamus est une structure bien conservée parmi les mammifères, de sorte que l'organisation générale de celle-ci ne diverge pas drastiquement d'un mammifère à un autre (Swanson and Sawchenko 1983). L'hypothalamus est une petite région située au niveau ventrale du cerveau, juste au-dessus de la glande pituitaire et occupant le pourtour du 3^e ventricule (3V). D'un point de vue sagittal, l'hypothalamus s'étend rostralement du chiasma optique jusqu'à la fosse interpedonculaire caudalement. L'hypothalamus est délimité par quatre structures : la lamina terminalis antérieurement, l'hypophyse ventralement, les corps mamillaires (CM) postérieurement et le sulcus hypothalamique supérieur qui crée une délimitation par rapport au thalamus. L'organisation de cette structure discrète est bien conservée chez les vertébrés, ce qui fait en sorte que plusieurs modèles animaux peuvent contribuer à élargir nos connaissances en rapport avec cette région. Elle est classiquement divisée en quatre sections selon un axe rostro-caudal (préoptique, antérieur, tubérale et mamillaire) (Fig.3), qui sont sous-divisées selon des axes ventral-dorsal (basal-alaire) et médio-latéral. L'hypothalamus est composé de faisceaux et de onze noyaux impliqués, entre autres, dans le contrôle de l'homéostasie (Fig.1) (Seoane-Collazo, Fernø et al. 2015). Afin de coordonner tous ses rôles, l'hypothalamus a la surprenante capacité de continuellement mettre

à jour l'état du système nerveux en recevant et en intégrant une quantité colossale de signaux provenant du reste du cortex et de la périphérie (Sato, Imai et al. 2017).

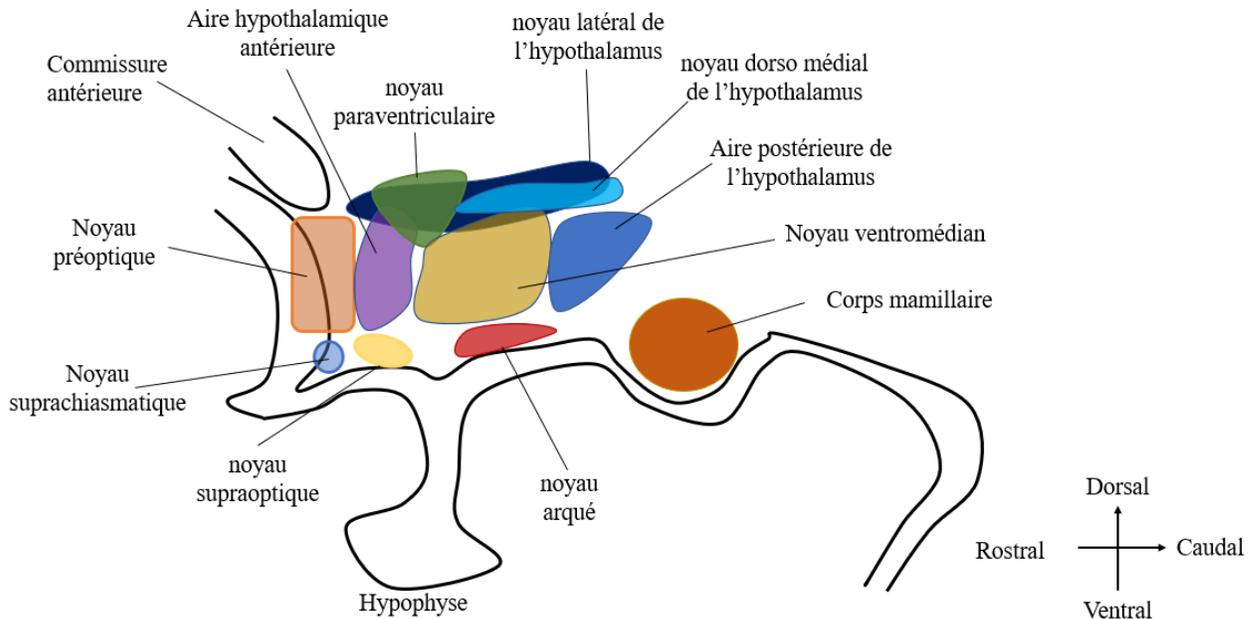


Figure 1. Représentation des onze noyaux de l'hypothalamus d'un point de vue sagittal.

De la gauche vers la droite ; Noyau suprachiasmatique (SCN), Noyau préoptique (NPO), Noyau supraoptique (SON), Aire hypothalamique antérieure (aHA), Noyau périventriculaire (PVN), Noyau ventromédian (VMN), Noyau arqué (ARC), Noyau latéral de l'hypothalamus (LH), Noyau dorso médial de l'hypothalamus (DMV), aire postérieure de l'hypothalamus (aHP) et les corps mamillaires (CM) (Adapté de Gao, Sun et al. 2016)

1.1.1 Noyaux

Il y a onze noyaux et ceux-ci sont distribués selon des axes médio-latéral, rostro-caudal et dorso-ventral. Le noyau préoptique est impliqué dans des processus parasympathiques dont le contrôle de la thermorégulation et la régulation neuroendocrine du comportement sexuel (Iwasaki, Jodo et al. 2010, Shell, Farmer et al. 2019). Les noyaux de la région antérieure, le noyau supraoptique (SON), le noyau suprachiasmatique (SCN), l'aire hypothalamique antérieure (aPV) et le PVN, sont également impliqués de façon générale, mais non exclusive, dans les processus parasympathiques. Ils sont impliqués, entre autres, dans le contrôle de la prise alimentaire, les cycles circadiens et le maintien de processus homéostatiques (Gao, Sun et al. 2015). Par exemple, le SON contient des neurones sécrétoires magnocellulaires sensibles à la pression osmotique du sang et rééquilibrent la pression hydrique en relâchant l'arginine

vasopressine directement dans les capillaires sanguins au niveau de l'hypophyse postérieure (Ranson, Motawei et al. 1998). Bien que l'hypothalamus antérieur soit impliqué dans le contrôle de l'équilibre énergétique, certains noyaux de la région tubérale participent également à cette régulation et à la réponse au stress (Flak, Goforth et al. , Harter, Kavanagh et al. 2018, Abuzzahab, Roth et al. 2019). Il s'agit du noyau arqué (ARC), du noyau ventromédial (VMN) et du noyau dorsomédial (DMN). Ces noyaux permettent de faire le pont entre les informations reçues et une réponse neurohormonale adéquate via différents types de neurones sécrétoires. On distingue deux grands types de neurones effecteurs dans l'hypothalamus, soit les neurones magnocellulaires et parvocellulaires. Les neurones magnocellulaires se trouvent dans le PVN et le SON, où ils relâchent directement l'ocytocine et la vasopressine dans le lobe postérieur de l'hypophyse (Swanson and Sawchenko 1983). Les neurones parvocellulaires sont situés dans plusieurs noyaux, dont le noyau préoptique, ARC, PVN ainsi qu' aPV et projettent à l'éminence médiale où ils relâchent via la veine porte leurs hormones de relâche ou d'inhibition à l'adénohypophyse (Flament-Durand 1980). Finalement, les CM participent à la réponse au stress, l'aspect motivationnel et dans la mémoire épisodique ainsi que spatiale (Rolls 2015). En effet, une lésion des CM ou un défaut dans cette région est associé au syndrome de Korsakoff (Dillingham, Milczarek et al. 2021).

1.2 Fonctions de l'hypothalamus

L'hypothalamus est une structure dont l'organisation est bien préservée d'un mammifère à un autre, mis à part le système neurosécrétoire des neurones magnocellulaires (Swanson and Sawchenko 1983). Malgré l'aspect répétitif de sa structure d'une espèce à une autre, la richesse des populations de neurones qui le composent met en relief la diversité de ses fonctions. De nombreuses afférences provenant de la circuiterie locale, des systèmes circulatoires périphériques et du système sensoriel convergent sur les différentes populations de neurones de l'hypothalamus afin de maintenir plusieurs processus neurohormonaux, autonomiques et comportementaux. Étant donné la complexité de ses réseaux et du chevauchement des fonctions entre plusieurs noyaux, ses diverses fonctions seront présentées de façon plus générale.

1.2.1 Reproduction et Croissance

Le noyau périventriculaire (aPV) relâche l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) dans le but de contrôler la sécrétion des hormones lutéinisantes (LH) et l'hormone

folliculostimulante (FSH) (Schauer, Tong et al. 2015). La régulation de cet axe varie beaucoup durant la période de la puberté, mais c'est l'effet de la testostérone qui influence grandement la composition du corps, notamment la grandeur squelettique (Rogol 2003). Outre cet axe, le noyau médial de l'amygdale projette à l'aire préoptique de l'hypothalamus et serait responsable de la transmission d'informations relatives aux phéromones. Cette région contient également des neurones à kisseptine et ceux-ci projettent aux neurones GnRH, critique dans la puberté et pour la fertilité (Herbison 2016). La dopamine endogène produite par les cellules de l'ARC peut atteindre l'adénohypophyse par le système-porte vasculaire et exercer un rôle inhibiteur sur le relâche de prolactine qui participe au contrôle de la croissance des glandes mammaires et de la production de lait par celles-ci (Ben-Jonathan, Arbogast et al. 1989). La relâche de prolactine semble également régulée in vitro par la thyrotropine (TRH) produite par les cellules du PVN qui projettent à l'adénohypophyse pour stimuler le relâche de thyrotropine (TSH) (Samson, Taylor et al. 2003). Cette dernière a pour effet d'influencer la quantité d'hormones T3 et T4 relâchés par la glande thyroïde. La corticolibérine (CRH) est également produite par les cellules parvocellulaires du PVN comme la TRH et est responsable de la relâche de l'ACTH pour activer la production de glucocorticoïdes par les glandes surrénales.

1.2.2 Contrôle homéostasique

Comme l'hypothalamus est une structure qui a une capacité puissante d'actualiser l'information provenant des zones extra et intra-hypothalamiques, elle est également dotée d'une capacité à optimiser le point d'équilibre. Parmi les fonctions qu'elle assume, on peut compter la régulation de la température, la concentration des liquides, le contrôle électrolytique, les fonctions cardiaques et respiratoires. Les neurones de la région pré optique déchargent de façon tonique, mais la fréquence de décharge augmente avec la température (Morrison and Nakamura 2011). Un changement important dans la température corporelle peut altérer la fluidité des membranes cellulaires ainsi que leur capacité de diffusion, déstabilisant le flux ionique et la capacité énergétique des cellules (Morrison and Nakamura 2011). Le noyau pré optique de l'hypothalamus est impliqué dans la perte de chaleur par la sudation en inhibant la relâche de thyrotropine (Morrison and Nakamura 2019). La partie antéroventrale de la partie antérieure de l'hypothalamus comprend les noyaux suprachiasmatiques (SCN) impliqué dans les cycles circadiens et l'état d'éveil/sommeil. La dopamine permet en partie de réguler cette rythmicité à partir de signaux provenant de la rétine (Ruan, Allen et al. 2008). Les SNC intègrent les informations provenant du nerf optique afin

de mettre à jour le système du corps sur le cycle de lumière extérieur, permettant ainsi de réguler le cycle d'éveil/sommeil (Collins, Pierre-Ferrer et al. 2020). Le noyau supraoptique (SON) contient des neurones qui vont relâcher la vasopressine (AVP) et l'ocytocine (Ox) dans la neurohypophyse. Ces neurohormones sont responsables respectivement de la régulation de la pression sanguine et de l'accouchement. La vasopressine, qui est relâché par la neurohypophyse, permet de réguler la pression sanguine en permettant une réabsorption de l'eau au niveau des reins (Prager-Khoutorsky, Choe et al. 2017).

1.2.3 Métabolisme et prise alimentaire

Certains neurones hypothalamiques sont sensibles aux substances présentes dans la circulation sanguine (Jiang, Gallet et al. 2020). Cela est possible, car certaines substances sont petites, solubles dans les lipides ou passent par les faibles jonctions serrées du système sanguin pour passer à travers la barrière hémato-encéphalique et influencer certains neurones sensibles à proximité de la circulation sanguine (Jiang, Gallet et al. 2020). Par ailleurs, le glucose qui circule dans la circulation sanguine peut passer la barrière via son transporteur (GLUT-1) et interagir avec des neurones qui expriment la glucokinase, comme ceux du SON (Ma, Ratnasabapathy et al. 2018). Cela permettant d'évaluer la glycémie sanguine et de l'ajuster en conséquence. Bien que l'hypothalamus produisent des hormones ayant des effets extra-hypothalamiques, des hormones originaires de tissus adipeux comme la leptine ou d'autres organes comme l'insuline du pancréas peuvent également interagir avec l'hypothalamus. En effet, la barrière hémato-encéphalique est particulièrement perméable au niveau de l'organe subfornicale et de l'organum vasculosum près de l'hypothalamus, ce qui permet aux différentes hormones circulantes de passer de la circulation sanguine aux récepteurs de différents neurones qui se trouvent dans les noyaux à proximité de cette perméabilité vasculaire. La leptine et l'insuline circulent par les voies sanguines le noyau arqué et communiquent avec d'autres composantes de l'hypothalamus comme le PVN afin de réguler la prise alimentaire (Pickavance, Dryden et al. 1996). Le PVN module la prise alimentaire via des projections au tronc cérébral, plus précisément le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau dorsal moteur du nerf vague (DMVN) dont l'activité est aussi régulée par des signaux provenant du tractus intestinal (Jhanwar-Uniyal, Beck et al. 1993, Ranson, Motawei et al. 1998). Le NTS et le DMVN modulent la prise alimentaire en régulant l'activité du système parasympathique innervant le tractus intestinal (Fig.3).

1.2.4 Comportementales et cognitives

La partie postérieure comprend les CM et sont impliqués dans l'excitation (arousal), la mémoire et le stress (Sziklas and Petrides 1998). Le circuit de Papez a mis en relief l'importance des CM comme relai de l'hippocampe vers le noyau thalamique antérieur dans l'aspect de mémoire. En effet, ils reçoivent de nombreuses projections de l'hippocampe, plus précisément du subiculum, via le fornix. Comme les CM sont impliqués dans la consolidation de la mémoire spatiale et épisodique, une lésion à cette région cause l'amnésie (Vertes, Albo et al. 2001). Les CM ont également des connexions bilatérales avec le tegmentum et le cervelet, faisant en sorte qu'ils ont une influence sur les structures reliées au tegmentum dont l'amygdale, le cortex préfrontal, l'hippocampe et le noyau accumbens. L'implication des CM peut donc être indirectement reliée à l'attention, la prise de décision, la mémoire et les émotions (Redila, Kinzel et al. 2015). De plus, le noyau central de l'amygdale reçoit plusieurs inputs viscéraux et projette sur l'aire hypothalamique latérale, qui est impliqué dans la réponse vasculaire à la peur.

En conclusion. L'hypothalamus reçoit de multiples afférences dont la diversité est aussi riche que ses noyaux et met en relief ses rôles somatique, endocrine, limbique, circadien et cognitif.

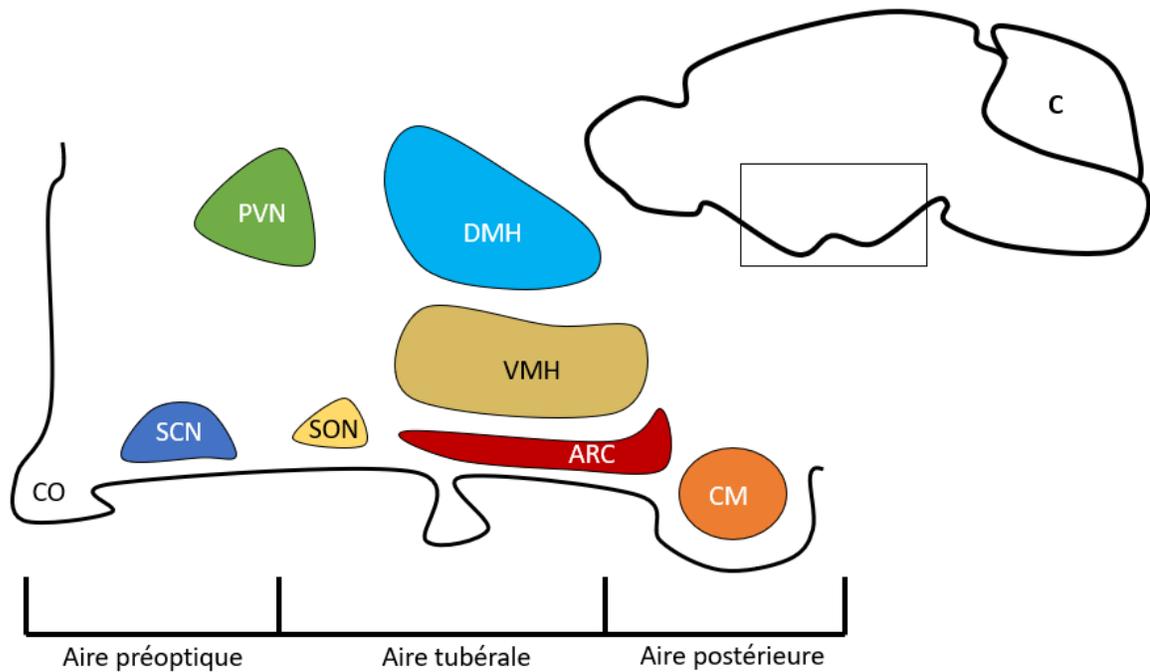


Figure 2. Divisions des aires hypothalamiques et leurs noyaux.

Représentation sagittale des différents noyaux de l'hypothalamus et leurs divisions respectives (pré optique, tubérale et postérieure). La portion sagittale du cerveau a été agrandie à partir du schéma du haut. De gauche à droite ; CO, chiasma optique; SCN, noyaux supra-chiasmatiques; PVN, noyau paraventriculaire; SON, noyau supraoptique; DMH, noyau dorsomédian de l'hypothalamus; VMH, noyau ventromédian de l'hypothalamus; ARC, noyau arqué; CM, corps mamillaires; C, cervelet. Davantage de détails sont disponibles dans l'article suivant (Burbridge, Stewart et al. 2016).

1.3 Fonction et structure du noyau paraventriculaire : neurones magnocellulaires

1.3.1 Les deux populations

Les neurones magnocellulaires sont retrouvés dans le PVN et le SON. Il faut souligner que le SON est formé de cellules du PVN prospectif qui migreront de façon latérale durant le développement (Xu and Fan 2007). Ces neurones sont de grand diamètre (20-40 μm) et produisent des hormones peptidiques relâchées dans la circulation sanguine par exocytose dans les capillaires de l'hypophyse postérieure (Swanson and Kuypers 1980, Sofroniew, Weindl et al. 1981). Deux populations distinctes de neurones magnocellulaires composent le PVN et le SON : les neurones à ocytocine (Oxt) et les neurones à arginine vasopressine (AVP) (Michaud 2001). Les projections des neurones magnocellulaires du PVN et du SON se rassemblent dans l'éminence médiale pour former le tractus hypothalamo-neurohypophysaire dont les fibres non-myélinisées se terminent sur les capillaires

fenêtres de l'hypophyse postérieure où elles sécrètent des neuropeptides, la vasopressine (AVP) et l'ocytocine (OT), qui agissent comme hormones (Eliava, Knobloch-Bollmann et al. 2016).

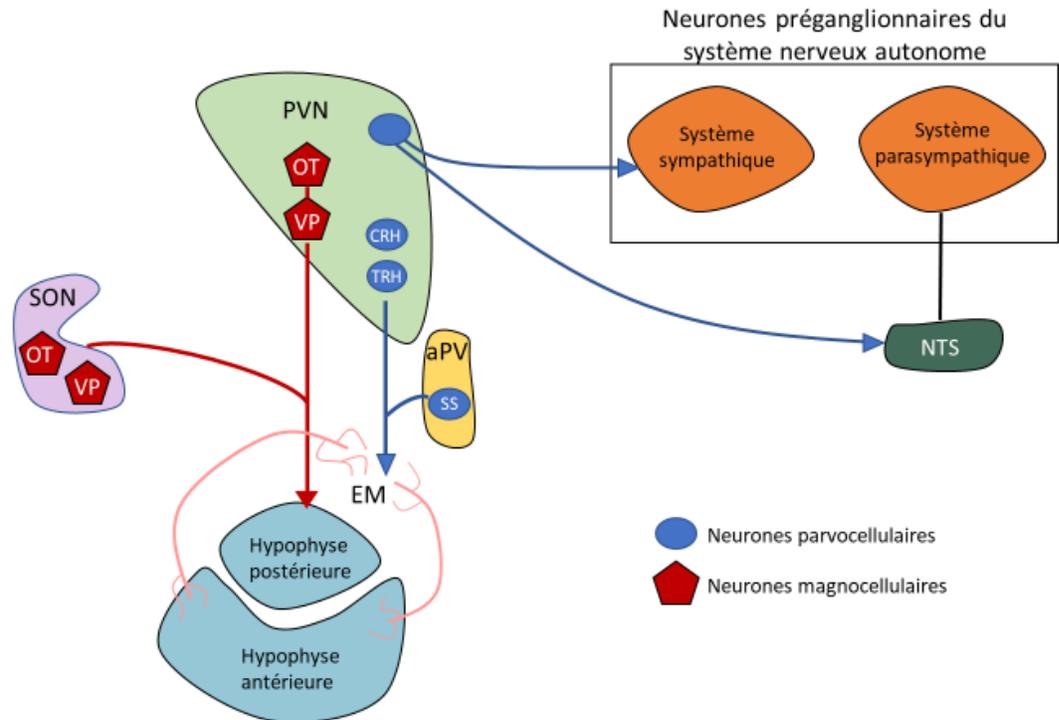


Figure 3. Les différents types cellulaires qui composent le PVN et les autres noyaux dans la circuitétrie vers l'hypophyse et d'autres structures extra hypothalamiques.

Le PVN comprends deux populations neuronales principales : les neurones magnocellulaires et les neurones parvocellulaires dont les axones projettent vers l'hypophyse antérieure ou postérieure et le système nerveux autonome. SON : noyau supraoptique, aPV : noyau périventriculaire antérieur, NTS : noyau du tractus solitaire, PVN : noyau paraventriculaire (Michaud 2001).

1.3.2 Rôle de VP et OT hypophysaire

L'AVP est une neurohormone qui est relâchée directement dans la circulaire sanguine générale à partir de la partie postérieure de l'hypophyse (Swanson and Sawchenko 1983). L'AVP agit au niveau des tubules collecteurs des reins où, en se liant à son récepteur V2, favorisera la réabsorption d'eau, modulant l'état d'hydratation et la pression artérielle (Bankir, Bichet et al. 2017).

L'OT est un neuropeptide qui est impliqué dans plusieurs processus physiologiques. Il est sécrété de la même façon que l'AVP, c'est-à-dire via le système de capillaires dans l'hypophyse postérieure (Swanson and Sawchenko 1983). Il est impliqué dans les comportements de

reproduction, la lactation, l'éjection de lait et le maintien de la parturition (Meyer-Lindenberg, Kirsch et al. 2011). Chez la femme, l'OT est sécrétée lorsque le col de l'utérus est dilaté, ce qui a pour effet de faire contracter de façon rythmique les muscles lisses de l'utérus pour l'accouchement (Kim, Bennett et al. 2017) (Kim, Sung Hye, Phillip R. Bennett, and Vasso Terzidou. 2017). Une fois la naissance, l'ocytocine promeut la lactation. La stimulation de succion lors de l'allaitement entraîne une boucle de rétroaction positive, faisant en sorte que davantage d'OT est relâchée par le PVN (Kim, Bennett et al. 2017).

1.4 Fonction et structure du noyau paraventriculaire : les neurones parvocellulaires

1.4.1 Les principales populations

Les neurones parvocellulaires, de plus petite taille que les magnocellulaires, peuplent également le PVN et synthétisent différents neuropeptides, incluant l'hormone thyroïdienne (TRH) et la corticolibérine (CRH) (Swanson and Sawchenko 1983). Ces neurones parvocellulaires projettent à l'éminence médiane où ils relâchent la TRH et la CRH qui seront transportées via la circulation portale à la partie antérieure de l'hypophyse (Swanson and Sawchenko 1983). Dans cette partie de l'hypophyse, la TRH et la CRH stimulent la sécrétion des hormones TSH et ACTH, respectivement, dans la circulation générale.

Mis à part cette circuiterie plus locale, une partie des neurones parvocellulaires projettent au noyau du tractus solitaire (NTS) et au noyau dorsal moteur du vague (NDMV) (Saper, Loewy et al. 1976). Cette connexion constitue un levier important quant à la régulation de l'apport alimentaire (Blevins and Baskin 2015) (Fig. 3).

1.5 Induction et régionalisation de l'hypothalamus durant le développement

L'hypothalamus prend son origine de la partie la plus antérieure de la région ventrale du tube neural. En effet, lors du développement, le système nerveux central est divisé en trois vésicules primaires : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Le prosencéphale se divisera en télencéphale antérieurement et en diencephale postérieurement. La partie ventrale du diencephale donnera naissance à l'hypothalamus, tandis que la partie dorsale deviendra le préthalamus et le thalamus (Acampora, Gulisano et al. 1999).

Il y a peu de gènes qui sont exprimés uniquement dans le territoire prospectif de l'hypothalamus. L'organisation de l'hypothalamus le long de l'axe dorsoventral et antéro-postérieur est le résultat

de l'expression de signaux provenant de ligands (Wnts, BMPs, Shh, inhibiteurs des Wnts) et de facteurs de transcription (Sim1, Nkx2.1, Nkx2.2, Six3, etc...). C'est dans l'optique d'une expression spatiotemporelle très dynamique de ceux-ci que l'hypothalamus prend ultimement forme. En effet, la section tubérale dérive des régions développementales plus ventrales (plaque basale et plancher), tandis que les sections antérieures proviennent de la plaque alaire (Pearson and Placzek 2013) (Fig. 5 et 6).

Lors de la formation précoce du tube neurale, des gradients d'antagonistes des Wnts (antérieurement) s'opposent à ceux des Wnts (plus postérieur) conduisant à une régionalisation de l'axe antéro-postérieur (Pearson and Placzek 2013, Alvarez-Bolado and SpringerLink 2018). Les inhibiteurs des Wnts promeuvent l'émergence de structures télencéphaliques exprimant Foxg10, tandis que les Wnts mènent au développement de structures exprimant Foxd1 pour former la partie hypothalamique du diencéphale ainsi que le préthalamus (Alvarez-Bolado and SpringerLink 2018). Les BMPs sont exprimés dans le plafond du télencéphale et contribuent aux divisions dorso-ventrales des sections alaire, basale et du plancher tôt dans le développement (Alvarez-Bolado and SpringerLink 2018).

Les cellules de la ligne médiane ventrale sont exposées à une glycoprotéine, Shh (Sonic hedgehog), dont l'absence résulte en une perte de l'hypothalamus et d'autres structures ventrales (Del Giacco, Sordino et al. 2006). Ces cellules se différencient en précurseurs hypothalamiques lors de la migration antéro-postérieure.

Shh est produit dans le mésoderme préchordal qui induit son expression dans la ligne cellulaire médiane-ventral rostrale du diencéphale (RDVM). D'autres ligands sont exprimés par le mésoderme préchordal, notamment NODAL. L'interaction croisée entre Nodal et Shh sont nécessaires au développement du RDVM, sans quoi plusieurs défauts de développement sont notables, dont la dorsalisation de l'hypothalamus (Burbridge, Stewart et al. 2016). Plusieurs études démontrent que la ligne médiane de l'hypothalamus ventrale dérive du RDVM (Burbridge, Stewart et al. 2016).

Les signaux de BMPs provenant du mésoderme préchordal répriment l'expression des Shh dans la plaque basale adjacente et régule à la hausse l'expression des BMPs et des FGFs. Les BMPs régulent l'expression du facteur de transcription NKX2.1, qui joue un rôle important pour le développement de noyaux dans la partie basale et celle

du plancher de l'hypothalamus (Ericson, Muhr et al. 1995, Kimura, Hara et al. 1996, Pabst, Herbrand et al. 2000). Cependant, l'expression seule de Shh et BMP7 n'est pas suffisante pour générer les tissus hypothalamiques. Il a été démontré que sans NODAL, le phénotype est très semblable à celui de l'absence de Shh (Wilson and Houart 2004). Alors, le trio Shh, BMP7 et NODAL participerait à la différenciation des cellules de l'hypothalamus ventral par leur action sur NKX2.1.

Dans les étapes plus tardives de l'induction et de la régionalisation de l'hypothalamus, les Wnts jouent également un rôle de raffinement du plancher hypothalamique en restreignant le domaine d'expression des FGF rostralement et des BMP caudalement (Burbridge, Stewart et al. 2016).

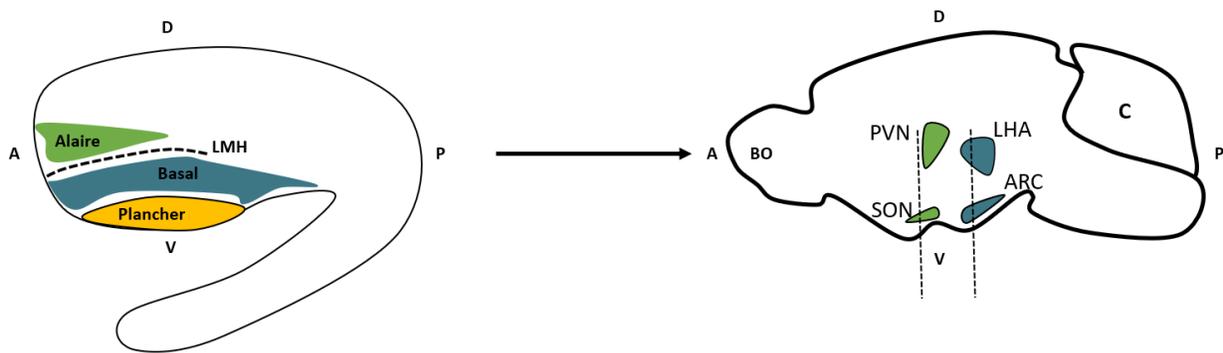


Figure 4. Origines développementales des noyaux de l'hypothalamus.

Une vue sagittale permet de voir les 4 sections de l'hypothalamus en développement : La plaque alaire (vert), la diagonale intra hypothalamique (gris), la plaque basale (turquoise) et le plancher (jaune). La couleur des noyaux représentés correspond à la couleur de la section d'origine. IHD, diagonale intrahypothalamique; PVH, noyau paraventriculaire; SON, noyau supraoptique; LHA, aire hypothalamique latérale; ARC, noyau arqué; BO; bulbes olfactifs, C, cervelet; A, antérieur; P, postérieur; D, dorsal; V, ventral. Figure inspirée de (Qin, Li et al. 2018).

1.5.1 Développement des cellules progénitrices en neurones organisés en noyaux

Outre le profil d'expression unique de facteurs de transcriptions et de ligands qui définissent les territoires hypothalamiques, les cellules progénitrices doivent se différencier, migrer et projeter leur axone aux cibles appropriées de sorte que l'hypothalamus soit fonctionnel. Les cellules progénitrices d'un même territoire ont des marqueurs communs. Par exemple, les marqueurs de la région tubérale (qui donneront naissance à ARC, DMN et VMN) comme NKX2.1 sont présents

dans la plaque basale et du plancher de l'hypothalamus en développement, mais pas dans la plaque alaire (Fig.5, 6 et 7). Dans la plaque alaire, les progéniteurs sont soumis à d'autres signaux dont Six3 et Six6 qui sont exprimés de façon transitoire dans le SON et le PVN pour être remplacés par l'expression d'Otp et du duo Sim1-ARNT2 (Burbridge, Stewart et al. 2016). De façon intéressante, un autre facteur de transcription, Fezf2, est nécessaire pour activer les gènes à homéodomaines dont Sim1 et ARNT2 (Burbridge, Stewart et al. 2016). L'influence des divers facteurs de transcription sur les cellules progénitrices sont illustrés (Fig.6 et 7).

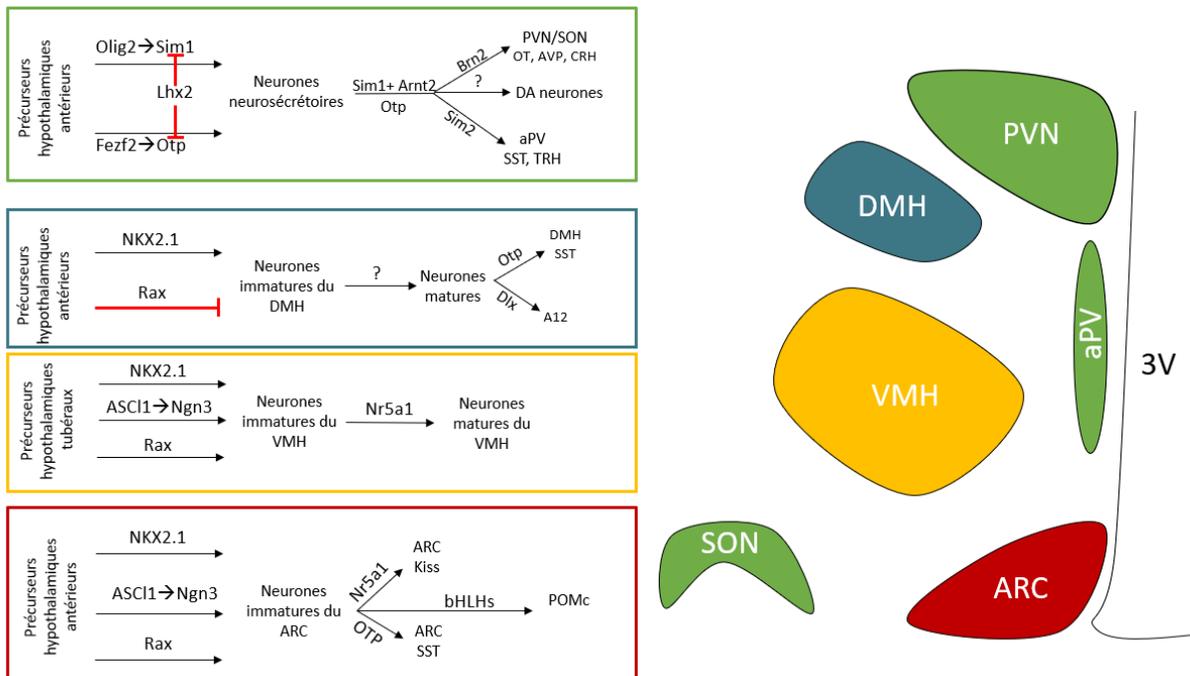


Figure 5. Cascade transcriptionnelle et région prospectrice des noyaux de l'hypothalamus.

Le développement des noyaux de l'hypothalamus dépend de l'influence de certains facteurs de transcription sur les cellules progénitrices de ces noyaux. Dans la section verte, on peut voir que *Otp* et la paire *Sim1/Arnt2* sont responsables de la transition des cellules progénitrices vers des neurones immatures du PVN, de l'aPV et du SON. L'entièreté des détails de ces cascades transcriptionnelles sont représentés dans ces articles (Burbridge, Stewart et al. , Bedont, Newman et al. 2015).

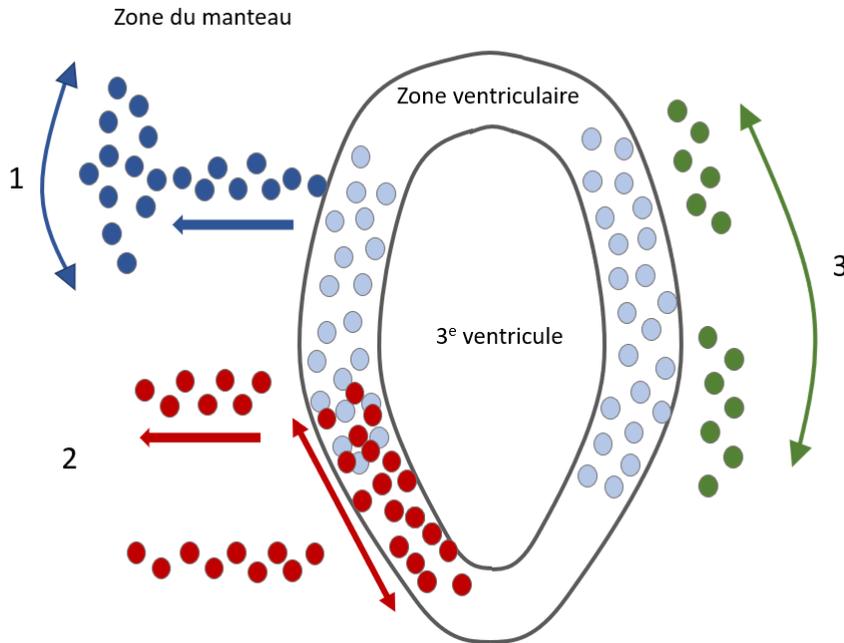


Figure 6. Les trois mécanismes de migration lors du développement des cellules progénitrices de l'hypothalamus.

(1) Les neurones quittent radialement la zone ventriculaire, puis se dispersent dans la zone du manteau. (2) Les neurones migrent à l'intérieur même de la zone ventriculaire avant de quitter radialement celle-ci dans la zone du manteau. (3) Les neurones quittent la zone ventriculaire et migrent parallèlement à la surface de la zone ventriculaire dès leur sortie de celle-ci. (Arnold-Aldea and Cepko 1996).

1.5.2 Prolifération et différenciation des neurones du noyau paraventriculaire

Outre les mécanismes qui permettent à l'hypothalamus d'être défini selon les axes antérieur-postérieur et dorsal-ventral, une organisation plus fine doit être faite afin que la complexité des noyaux qui composent l'hypothalamus soit possible.

1.5.2.1 Naissance des cellules modèle de neurogénèse « *outside-in* »

La neurogénèse a lieu dans la zone ventriculaire du 3^e ventricule (Arnold-Aldea and Cepko 1996). La prolifération de cellules progénitrices de neurones commence dès la fermeture du tube neural à 9 jours de gestation chez la souris (Bouret 2017). Une fois que les cellules ont terminé leur phase de division, ces cellules quitteront la zone ventriculaire pour migrer dans la zone du manteau radialement ou tangentiellement, les cellules qui naissent tardivement se retrouvant dans la région la plus médiane du manteau. C'est ce que l'on entend par le modèle « *outside-in* ». Quelques progéniteurs peuvent s'étendre de façon précoce dans la zone du manteau, puis migrer de façon

radiale une fois leur différenciation en neurone complétée (Arnold-Aldea and Cepko 1996). Il a été démontré chez les rongeurs que les cellules progénitrices des neurones magnocellulaires naissant entre les jours embryonnaires 10.5 et 12.5 (Fig. 8) (Karim and Sloper 1980, Okamura, Fukui et al. 1983). Une partie de ces cellules migrera de façon médiale en restant relativement près du 3^e ventricule pour donner naissance au PVN, tandis que l'autre partie migrera de façon latérale pour créer, plus ventralement, le SON (Karim and Sloper 1980).

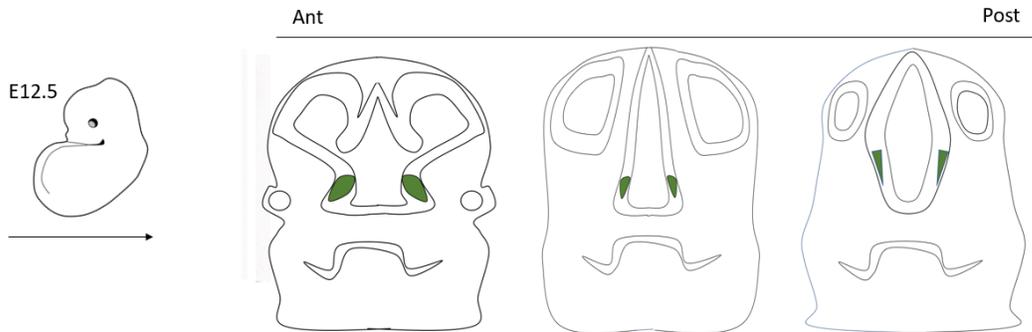


Figure 7. Vue coronale d'un segment antérieur et postérieur de l'hypothalamus chez la souris E12.5. (Jacobowitz 1998)

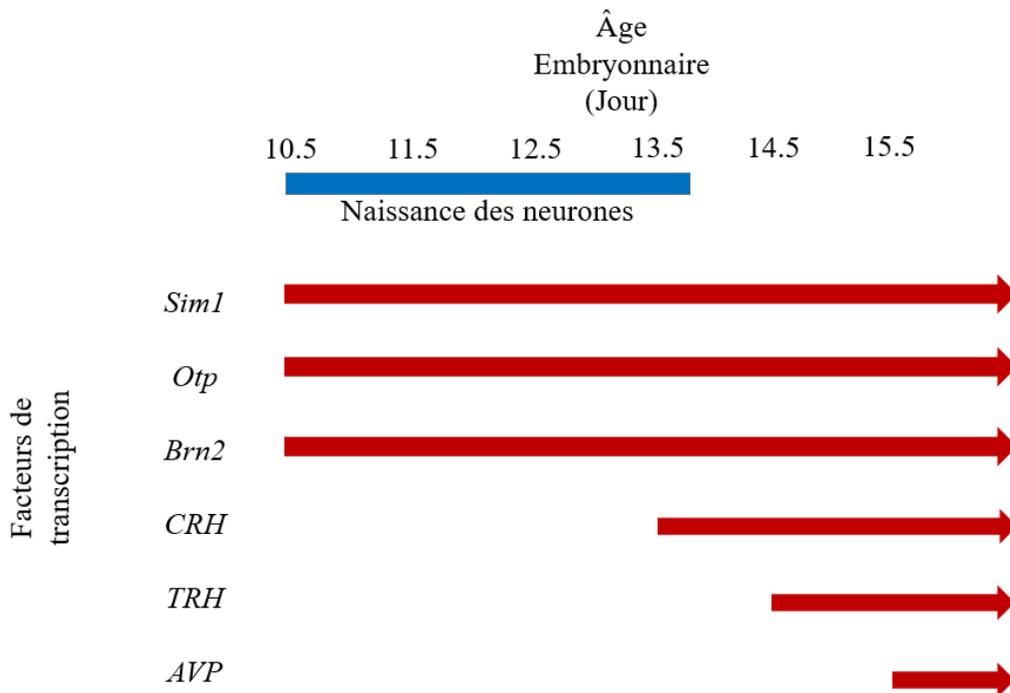


Figure 8. Fenêtre temporelle d'expression des facteurs de transcription dans l'hypothalamus antérieur des embryons de souris.

Les facteurs de transcriptions Sim1, Otp et Brn2 sont exprimés dès la naissance des neurones (entre les jours 10.5 et 12.5 embryonnaires), tandis que CRH, TRH et AVP sont exprimés plus tardivement dans les lignées de neurones différenciées plus spécialisées.

1.5.2.2 Différenciation

En utilisant des nucléosides radioactifs et le marquage par BrdU à différents âges embryonnaires, il a été possible de déterminer que la plupart des neurones qui constituent l'hypothalamus naissent entre les jours 10 à 14 embryonnaires (Fig.9) (Shimada and Nakamura 1973, Ishii and Bouret 2012). La façon précise par laquelle ces neurones se différencient dépend de facteurs de transcriptions. La décortication en détails de l'influence des facteurs de transcriptions impliqués dans la différenciation des types cellulaires du PVN reste incomplète. Cependant, quelques facteurs de transcription ont été davantage documentés et leur contribution au développement du PVN est importante, voire essentielle.

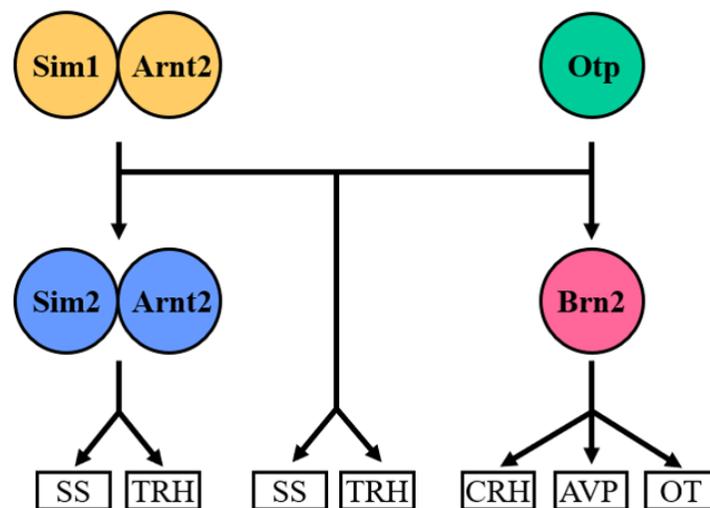


Figure 9. Cascade transcriptionnelles des différents facteurs menant aux cinq types cellulaires principaux qui composent l'hypothalamus antérieur.

Les facteurs de transcription Sim1 et Otp agissent de façon parallèle afin de maintenir l'expression de Sim2 et Brn2, dont l'intervention est cruciale pour la différenciation terminale des types cellulaires distincts (Caqueret, Yang et al. 2005).

Régulation transcriptionnelle du développement du noyau paraventriculaire

Les nombreux noyaux et sous-populations de neurones qui occupent l'hypothalamus nécessitent, au cours du développement, une orchestration fine et précise. Plusieurs facteurs de transcription contribuent à créer cette complexité hypothalamique. Bien qu'ils ne soient pas tous connus, plusieurs d'entre eux ont un rôle majeur dans son développement. Des études de séquençage d'ARN de cellules uniques ont révélé qu'il existe 34 groupes de neurones et 11 types de cellules non neuronales avec des signatures transcriptionnelles différentes au sein de l'hypothalamus (Chen, Wu et al. 2017, Lam, Cimino et al. 2017).

1.5.3 Rôle de POU3f2/Brn2

Le gène Brain-2 (Brn2), (également appelé POU3F2 ou N-Oct3), encode un facteur de transcription neural de classe III POU et se trouve sur la partie longue (q) du chromosome 6 chez l'humain. Le facteur de transcription POU3F2 appartient à la classe III à homéodomaines POU (Qin, Li et al. 2018).

1.5.3.1 Structure

Le gène *Pou3f2* est composé d'un exon de 4086 pb et ne comporte pas d'introns. La protéine produite est de 443 acides aminés (chez l'humain). La protéine résultante comporte deux domaines de liaison à l'ADN : un domaine spécifique POU et un homéodomaine.

1.5.3.2 Patron d'expression dans le cerveau adulte

Ce facteur de transcription est hautement exprimé dans le système nerveux central, mais aussi dans les tissus cardiaques, la glande thyroïde, la vessie, et les reins (Hagino-Yamagishi, Saijoh et al. 1997). POU3f2 est exprimé par tous les neurones magnocellulaires du SON et du PVN ainsi que par les neurones parvocellulaires du PVN exprimant la CRH.

1.5.3.3 Rôle dans le développement du PVN

Brn2/POU3f2 joue un rôle clé dans la différenciation neuronale en se liant à des séquences spécifiques, consistant en deux sites distincts GCAT et TAAT séparés par une région non conservée de 0, 2 ou 3 nucléotides. Ce facteur de transcription contrôle le développement de plusieurs types de neurones dans l'hypothalamus (Nakai, Kawano et al. 1995, Schonemann, Ryan et al. 1995). En effet, il agit en aval de Sim1 et d'Otp pour permettre la différenciation terminale des neurones à AVP, Oxt et CRH (Nakai, Kawano et al. 1995, Schonemann, Ryan et al. 1995).

(Nakai, Kawano et al. 1995, Schonemann, Ryan et al. 1995). Des travaux suggèrent que POU3F2 contrôle directement l'expression des gènes de la CRH et de l'OT (Andersen and Rosenfeld 2001).

La génération d'une souris ayant une délétion de *Pou3f2* a été effectuée par deux équipes de recherche. Une première équipe a créé une lignée mutante pour ce gène en induisant une délétion de 60% de l'extrémité carboxyl terminale (Nakai, Kawano et al. 1995). Cette équipe a montré que les souris homozygotes pour cette mutation meurent rapidement après leur naissance, ne survivant pas après 10 jours de vie. Les souris qui ont survécu jusqu'à P10 montrent un retard de croissance marqué, un manque d'accumulation de tissu adipeux brun, mais une accumulation de tissu adipeux au niveau du foie qui persiste après une semaine. Au niveau du système nerveux, ces mutants homozygotes montrent une hypoplasie de la neurohypophyse, l'absence de fibres nerveuses provenant des neurones AVP, et l'absence de neurones magnocellulaires AVP et Oxt dans le PVN et le SON ainsi qu'une absence des neurones parvocellulaires à CRH dans le PVN (Nakai, Kawano et al. 1995). Chez les hétérozygotes, on note une diminution de l'expression de AVP et Oxt, mais sans changement morphologique au niveau de l'hypothalamus. De plus, une deuxième équipe a généré une souris mutante pour le gène *Pou3f2* en retirant l'exon complet ainsi que les régions flanquantes (Schonemann, Ryan et al. 1995). Ils ont confirmé les mêmes pertes de cellules hypothalamiques chez l'homozygote de *Pou3f2*. Aucun souriceau homozygote n'a survécu au-delà de la première semaine de vie. Ceux-ci démontrent un retard de croissance, bien qu'ils aient une morphologie indissociable des autres membres de la portée à la naissance (Schonemann, Ryan et al. 1995). La différence observée entre les deux équipes a été la diminution de l'expression de SS chez l'homozygote à E18.5 pour l'équipe de Nakai, tandis qu'aucune différence n'a été observée pour l'équipe de Shonemann.

1.5.4 Rôle de SIM1 et ARNT2

1.5.4.1 Structure

Le gène *Sim1* a été d'abord identifié chez la drosophile. Il code pour un facteur de transcription de la famille BHLH-PAS. Il comprend un domaine basique capable de lier l'ADN via la séquence spécifique G/ATACGTGA sur le promoteur de gènes et un domaine hélice-boucle-hélice liant une paire de motifs PAS (*Per Arnt Sim*). Ces domaines PAS confèrent une spécificité d'hétérodimérisation. Cependant, les facteurs de transcription de la famille BHLH-PAS peuvent être actifs sous forme d'hétérodimères ou d'homodimères. *Sim1* requiert un partenaire de la famille

des BHLH-PAS, c'est-à-dire *Arnt2* afin d'exercer son rôle dans le développement de l'hypothalamus. Le gène *ARNT2* (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2) est un facteur de transcription de type BHLH-PAS et reconnaît spécifiquement les éléments de réponses xénobiotiques (XRE) et les protéines hélice-boucle-hélice. Il forme un dimère avec *Sim1*.

1.5.4.2 Patron d'expression

Le gène *Sim1* est exprimé dans l'aPV, le noyau postérieur de l'hypothalamus, PVN, SON, et dans le noyau du tractus olfactif latéral chez l'embryon dès que ces cellules quittent le cycle cellulaire. Ces patrons d'expression persistent chez la souris adulte et même une fois adulte. Le gène *Sim1* (Single-minded homolog 1) est hautement exprimé dans les reins, le pancréas et dans le tissu du système nerveux central. Il est également exprimé dans certaines parties de l'hypothalamus, dont le SON, PVN, aPV et les CM. *Sim1* et *Arnt2* sont fortement co-exprimés dans l'hypothalamus antérieur (Michaud, DeRossi et al. 2000).

Rôle dans le développement du PVN

Sim1 et son partenaire *Arnt2* forment un hétérodimère afin de réguler la différenciation neuronale terminale de plusieurs lignées incluant celles du PVN et du SON (Eaton and Glasgow 2007). De plus, ce dimère dirige l'extension des axons hypothalamo-spinaux (Schweitzer, Lohr et al. 2013). Un génotype homozygote pour le gène *Sim1* met en relief des souriceaux qui meurent peu de temps après la naissance et qui montrent une hypoplasie importante du PVN et du SON en plus d'une perte des neurones à somatostatine (SST), TRH, CRH, AVP et OT (Michaud, Rosenquist et al. 1998). Certains groupes de recherche ont analysé les embryons homozygotes pour découvrir non seulement une absence du PVN/SON, mais également des défauts de migration. Alors, *Sim1* est nécessaire pour le développement des lignées cellulaires au sein du PVN/SON et pour la migration fonctionnelle de ceux-ci. Comme *Arnt2* forme un hétérodimère avec *Sim1*, une perte homozygote de ce facteur de transcription entraîne les mêmes défauts développementaux et migratoires qu'en l'absence de *Sim1* (Michaud, DeRossi et al. 2000). *Sim1* est également impliqué dans le développement des CM (Marion, Yang et al. 2005).

La fonction du dimère *Sim1* et *ARNT2* semble médiée au moins en partie par le facteur de transcription *POU3F2*, requis pour la survie et la différenciation terminale des neurones AVP, OT, CRH (Michaud, Rosenquist et al. 1998).

1.5.5 Rôle d'OTP

1.5.5.1 Structure

Le gène *Otp* (Orthopedia homeobox) appartient à la famille des homéodomaines. Le gène se trouve sur le chromosome 5 chez l'humain et comporte 3 exons. La protéine issue de ce gène a une structure en hélice-coude-hélice et se lie sur la région promotrice d'autres gènes afin de réguler leur transcription.

1.5.5.2 Patron d'expression

L'ARN est exprimé de façon ubiquitaire dans plusieurs organes de différents systèmes, dont le cœur, les reins, les testicules et le cerveau. *Otp* est exprimé dans l'hypothalamus dans les mêmes domaines que *Sim1*, ce dès que les cellules quittent le cycle cellulaire à 10,5/11,0 jours embryonnaires et pour toute la vie de la souris (Acampora, Postiglione et al. 1999, Wang and Lufkin 2000, Moir, Bochukova et al. 2017). Les patrons d'expression d'*Otp* et de *Sim1* sont donc identiques tant au plan spatial qu'au plan temporel, la seule exception étant que *Otp* est aussi exprimé dans le noyau arqué.

Rôle dans le développement du PVN

Otp joue le même rôle pour le développement de l'APV, PVN et SON que *Sim1* (Acampora, Postiglione et al. 1999, Wang and Lufkin 2000). *Otp* et *Sim1* ne contrôlent pas leur expression respective, suggérant qu'ils agissent en parallèle pour le développement de l'hypothalamus antérieur.

Voici un tableau récapitulatif des différents mutants générés pour le gène *Otp* chez la souris.

Auteur des articles	Exon affecté	Type de mutation	Effets sur les lignées cellulaires chez l'homozygote	Phénotype
(Acampora, Postiglione et al. 1999)	1 et 2	Recombinaison homologue menant à un délétion et fusion de la séquence codante pour LacZ	PVN et SON hypocellulaire TRH, CRH, OT et AVP non exprimé dans le PVN ni dans le SON	NA

(Moir, Bochukova et al. 2017)	2	Mutation faux-sens d'une arginine pour une tryptophane (R108W)	Augmentation de l'expression de POMc, diminution de AVP, OT, Thr, SS, Sim1. Diminution de OT, Otp et AVP dans PVN.	Léthalité périnatale, les souris hétérozygotes sont obèses
(Wang and Lufkin 2000)	3	Insertion du rapporteur LacZ au niveau du 3 ^e exon	Régions entourant le 3 ^e ventricule sont hypocellulaires Absence d'AVP, CRR et TRH dans le PVN et SON. OT est absent du PVN et drastiquement diminué dans le SON	NA

1.6 Contrôle de l'équilibre énergétique par le noyau paraventriculaire

1.6.1 Circuits hypothalamiques impliqués dans le contrôle de l'équilibre énergétique

Le noyau arqué, par sa proximité avec le réseau de capillaires fenêtrés qui compose l'éminence médiane, est un contact de première ligne avec les hormones circulantes (ex : insuline, leptine) et les nutriments présents dans le sang. Ce noyau agit ainsi comme intégrateur de l'état énergétique de l'organisme et maintient l'homéostasie énergétique en contrôlant la prise alimentaire et les dépenses énergétiques principalement via des projections au PVN (Fig.11). Le noyau arqué contient deux populations de neurones : l'une est orexigène, l'autre anorexigène (Konturek, Konturek et al. 2004). Les neurones orexigènes du noyau arqué synthétisent du GABA et sont identifiables par la production de la NPY et de l'AgRP alors que les neurones anorexigènes sont identifiables par la production de la POMc et de la CART. Ces populations projettent leurs axones

au PVN. Les neurones qui expriment NPY inhibent l'activité des neurones anorexigènes du PVN, en agissant sur les récepteurs Y1/Y5 de ceux-ci. Les neurones exprimant AgRP dans l'ARC inhibent l'activité des neurones anorexigènes du PVN en bloquant le récepteur MCR-4. Leur action concertée a pour but de promouvoir la prise alimentaire. À l'opposé, l'activation des neurones POMc//CART mène à la production d'alpha-MSH qui réduit la prise alimentaire par leur action sur le récepteur MCR-4. Les neurones NPY/AgRP et POMc/CART agissent ainsi de manière antagoniste sur les neurones MCR-4 du PVN. Le PVN intègre beaucoup de signaux provenant, entre autres, du noyau arqué et projette aux noyaux du tractus solitaire et du dorsal moteur du vague dans le tronc cérébral via lesquels il module le système autonome et la prise alimentaire (Konturek, Konturek et al. 2004).

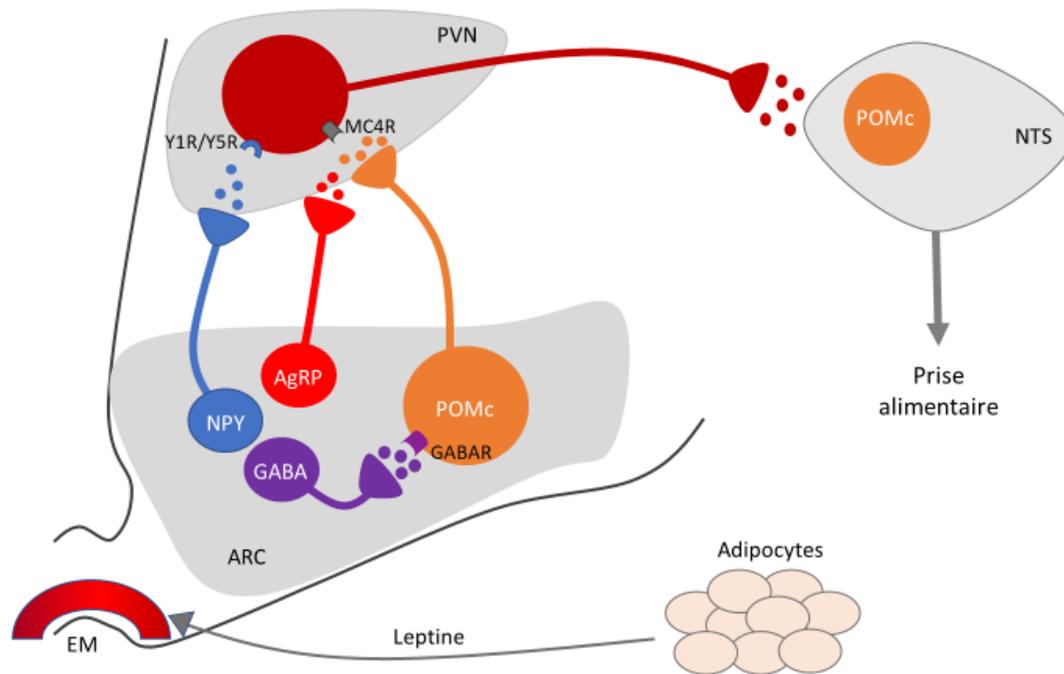


Figure 10. Circuiterie hormonale et neuronale de la prise alimentaire. Les adipocytes sécrètent de la leptine lors de la prise alimentaire.

Le changement de la concentration sanguine de la leptine est détecté par le noyau arqué (ARC). La leptine se lie sur les récepteurs ObR des neurones NPY/AgRP pour les inhiber, et sur les récepteurs ObR des neurones POMc pour les activer. Les neurones NPY/AgRP sont orexigènes et promeut la prise alimentaire. Les neurones POMc sont anorexigènes et promeut l'arrêt de la prise alimentaire. Les neurones NPY agissent sur leur récepteurs Y1 et Y5 sur les neurones du PVN, tandis que les neurones AgRP sécrètent un neurotransmetteur qui compétitionnent contre l'alpha-MSH des neurones POMc pour les MCR4R. Les neurones coexpriment NPY et AgRP, la séparation des deux sur le schéma sert à clarifier le rôle de chacun.

1.7 Impact de l'haploinsuffisance de *SIMI* sur la prise alimentaire

Comme la formation de l'hypothalamus doit être précisément orchestré, de nombreux facteurs de transcriptions et de gènes doivent intervenir pour créer une aussi grande complexité de noyaux. Lorsqu'une mutation interfère avec le bon fonctionnement d'un facteur de transcription ou de l'intégrité d'une protéine, il peut y avoir des répercussions importantes sur l'homéostasie. Pour ce qui entoure la prise alimentaire, de nombreuses mutations ont été répertoriées. La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes et supprime la prise alimentaire. Un déficit congénital en leptine cause une hyperphagie prononcée et une obésité sévère due à un manque d'inhibition par rapport à la prise alimentaire (Wasim, Awan et al. 2016). Une autre maladie avec un phénotype semblable est liée à l'haploinsuffisance du gène *SIMI*. La diminution du dosage de *SIMI* engendre une perturbation de la fonction du PVN conduisant à une obésité secondaire à une hyperphagie se manifestant dès l'enfance (Bonfond, Raimondo et al. 2013).

1.7.1 4.2.1 Hyperphagie et obésité associée à l'haploinsuffisance de *SIMI*

1.7.1.1 Chez l'homme

Une translocation équilibrée causant une perturbation du gène *SIMI* a été identifiée chez une fillette présentant une obésité précoce par hyperphagie, et ce, sans changement au niveau de la dépense énergétique (Holder, Butte et al. 2000). Plusieurs études ont permis de répertorier des mutations intragéniques de *SIMI* chez des individus présentant une obésité infantile (Faivre, Cormier-Daire et al. 2002, Bonfond, Raimondo et al. 2013).

1.7.1.2 Chez la souris

Les souris qui sont homozygotes pour le gène *Sim1* ne survivent pas et le développement de leur PVN, SON, et aPV est aboli. Chez les souris hétérozygotes, une obésité est observée comme pour les humains atteints de cette mutation (Michaud 2001).

Ces souris sont obèses par hyperphagie, sans diminution des dépenses énergétiques (Michaud 2001). Afin de confirmer que l'obésité était due uniquement à un apport plus important en nourriture, leur apport en nourriture a été mesuré et leur dépense énergétique a été comparée à des souris sauvages et aucune différence n'a été observée pour la dépense énergétique.

1.7.1.3 Rôle postnatal vs développemental

Pendant le développement, SIM1 est exprimé et contribue au développement du SON, PVN et aPV (Michaud 2001). Chez la souris adulte, l'expression de ce facteur de transcription persiste dans les neurones, ce qui suggère que *Sim1* a en fait un rôle physiologique et non seulement développemental dans la régulation de l'équilibre énergétique (Tolson, Garcia et al. 2014). En effet, certaines études ont démontré que l'inactivation neuronale conditionnelle de *Sim1* chez la souris adulte cause également une obésité par hyperphagie et une réduction de l'expression d'ocytocine (Tolson, Garcia et al. 2014).

1.7.1.4 Mécanismes cellulaires sous-tendant le contrôle de la prise alimentaire par SIM1

Une population de neurones parvocellulaires du PVN exprimant l'OT projette au noyau dorsal moteur du vague localisé dans le tronc cérébral et y module l'activité du système autonome. Les projections de ce noyau contrôlent la sécrétion et la motilité du tractus intestinal, ce qui a pour effet de contribuer à la sensation de faim (Guzmán, Hernández-Coronado et al. 2019). Il a été montré que l'haploinsuffisance de *Sim1* se traduit par une diminution importante de l'expression de l'OT dans ces neurones parvocellulaires du PVN et que l'administration intra-cérébrale de l'OT peut corriger l'hyperphagie de souris *Sim1*^{+/-}, suggérant que la diminution du dosage génique de *Sim1* perturbe la prise alimentaire en perturbant l'expression de cet effecteur (Holder, Butte et al. 2000, Caqueret, Yang et al. 2005, Duplan, Boucher et al. 2009).

1.7.2 Impact de l'haploinsuffisance de OTP, ARNT2 et POU3F2 sur l'équilibre énergétique

ARNT2 est le partenaire de dimérisation de SIM1 et l'haploinsuffisance d'ARNT2 mène également à une obésité par hyperphagie chez la souris (Michaud, DeRossi et al. 2000, Hosoya, Oda et al. 2001). De façon intéressante, une étude récente a montré qu'une mutation faux sens hétérozygote d'OTP, qui agit en parallèle de SIM1, induit aussi une obésité par hyperphagie chez la souris (Moir, Bochukova et al. 2017) Il reste incertain si des mutations d'*ARNT2* et *OTP* sont une cause d'obésité chez l'humain (Moir, Bochukova et al. 2017). Par contre, une étude récente a rapporté la présence d'obésité chez des patients avec une haploinsuffisance de *POU3F2* (Kasher, Schertz et al. 2016). Toutefois, il reste inconnu si l'haploinsuffisance de *Pou3f2* cause une obésité chez la souris. Il est intéressant de noter que tous ces gènes interagissent pour contrôler le développement du PVN, suggérant qu'il pourrait aussi influencer la prise alimentaire via les mêmes mécanismes.

Hypothèses et buts

La cascade transcriptionnelle menant à la formation du PVN par l'entremise de différents facteurs de transcription a été présentée (Fig. 10), mais elle est incomplète. En effet, le facteur de transcription *Sim1* et *Otp* sont tous deux essentiels pour le développement approprié de l'hypothalamus antérieur, les deux sont exprimés dès la naissance des neurones et agissent sur *Brn2/POU3f2* pour la différenciation de cellules en neurones à AVP, Oxt et CRH. De plus, ils ont le même patron d'expression, mis à part pour ARC, où seulement *Otp* est exprimé et ils ne régulent pas leur expression mutuelle. Notre hypothèse est que OTP et SIM1 interagissent en régulant des voies parallèles qui convergent sur les mêmes cibles ou en formant un complexe protéique pour participer au développement de l'hypothalamus antérieur et au contrôle de la prise alimentaire. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons généré un nouvel allèle nul d'*Otp* à l'aide de la technologie Crispr-cas9 et chercher à déterminer si *Sim1* et *Otp* interagissent pour le contrôle de l'équilibre énergétique.

Otp et *Sim1* contrôlent l'expression de *Pou3f2* qui est requis pour le développement des neurones du PVN/SON qui expriment l'AVP, l'OT et la CRH. Le programme développemental contrôlé par *Pou3f2* reste mal connu. Afin de disséquer ce programme, nous avons généré une lignée transgénique qui exprime de façon ectopique *Pou3f2* dans l'hypothalamus antérieur et avons caractérisé son transcriptome dans le contexte d'un autre projet. Afin de valider ces résultats, nous visons à étudier les patrons d'expression d'une série de gènes par hybridation *in situ*. Par ailleurs, nous avons généré et caractérisé une lignée de souris avec une perte de fonction de *Pou3f2* à l'aide de la technologie Crispr-cas9. Ce modèle de perte de fonction et celui de gain de fonction préalablement généré seront des outils précieux pour identifier les cibles de *Pou3f2* dans l'hypothalamus en développement et étudier son rôle pour l'équilibre énergétique.

CHAPITRE 2 Génération et caractérisation d'un nouvel allèle d'*Otp*

Introduction

Les facteurs de transcription SIM1 et OTP présentent le même patron d'expression et jouent un rôle similaire dans l'hypothalamus antérieur, soulevant la possibilité qu'ils interagissent pour le développement du PVN/SON. Nous pourrions évoquer au moins 3 possibilités : 1) SIM1 contrôle l'expression d'OTP ou vice-versa; toutefois, des données expérimentales suggèrent que ce n'est pas le cas (Acampora, Postiglione et al. 1999) ; 2) SIM1 et OTP contrôlent des voies qui convergent sur les mêmes cibles; 3) SIM1 et OTP sont des composantes du même complexe physique. Dans la perspective d'explorer ces différentes possibilités, nous avons d'abord visé à générer une lignée de souris porteuses d'un allèle nul d'*Otp*, en utilisant la technologie Crispr-cas9. Nous avons aussi cherché à caractériser ces souris et embryons porteurs de cet allèle afin d'en confirmer l'impact fonctionnel.

Matériel et Méthodes

Manipulation du gène *Otp* et *Sim1*.

La lignée *Otp*^{-/-} a été créée à l'aide de la technologie Crispr-cas9. Le gène *Otp* comporte trois exons, incluant l'exon 2 qui contient le domaine de liaison à l'ADN. Nous avons sélectionné deux paires de guides ARN afin de créer une délétion de ce dernier exon (Voir Annexe); ARNg1 (TTCCGCCTCGGGGCAAGCGT) dans le sens 5'-3' en amont de l'exon 2 et ARNg2 (CTCGACGCGCGAACAACAAAA) dans le sens 3'-5' en aval de l'exon 2). Ces guides et un vecteur exprimant cas9 ont été injectés dans des zygotes au McGill Integrated Core for Animal Modeling (MICAM). La caractérisation de l'allèle a été réalisée par séquençage de produits de PCR amplifiés avec une paire d'amorces (CGGGTGTGTTTCATTGTCAG) et (TCTGTCTCCCCAGAAGTCA). Nous avons préalablement généré un mutant pour le gène *Sim1*. Ce dernier a été généré en remplaçant le domaine bHLH par une cassette Tau-LacZ + PGK neo à l'aide d'un plasmide donneur et d'une recombinaison homologe (Marion, Yang et al. 2005).

Génotypage de l'allèle *Otp*⁻

L'exon 2 ayant été retiré, nous avons procédé à un génotypage à l'aide de deux PCR. Une première PCR permet de détecter une bande plus courte de 450pb correspondant à un mutant avec les paires

d'amorces (5'-CGGGTGTGTTTCATTGTCAG-3') et (5'-TAGCTTCTGGGGAGACGAGA-3'). Une deuxième PCR est effectuée avec des amorces à l'intérieur de l'exon 2 (5'-TGAAGTGTAGGCTGGGTGTG-3'),(5'-TCCTCACGCATGAAGATGTC-3'), discriminant les embryons ayant un génotype hétérozygote pour le gène *Otp* et ayant un génotype homozygote pour ce même gène. Si un produit est amplifié (350pb), cela indique que la présence d'un allèle sauvage est présente, ce qui correspond à un génotype hétérozygote ($Otp^{+/-}$). L'outil de traduction ExPasy avec l'évaluation SWISS-MODEL a permis d'observer les conséquences du retrait de l'exon 2 sur la structure tridimensionnelle de la protéine OTP. La protéine d'OTP a normalement une structure tridimensionnelle comportant 3 hélices reliées par des boucles. Or, la mutation que nous avons générée en retirant l'exon 2 a mené à la formation de trois hélices dont la troisième comporte plusieurs codons stop.

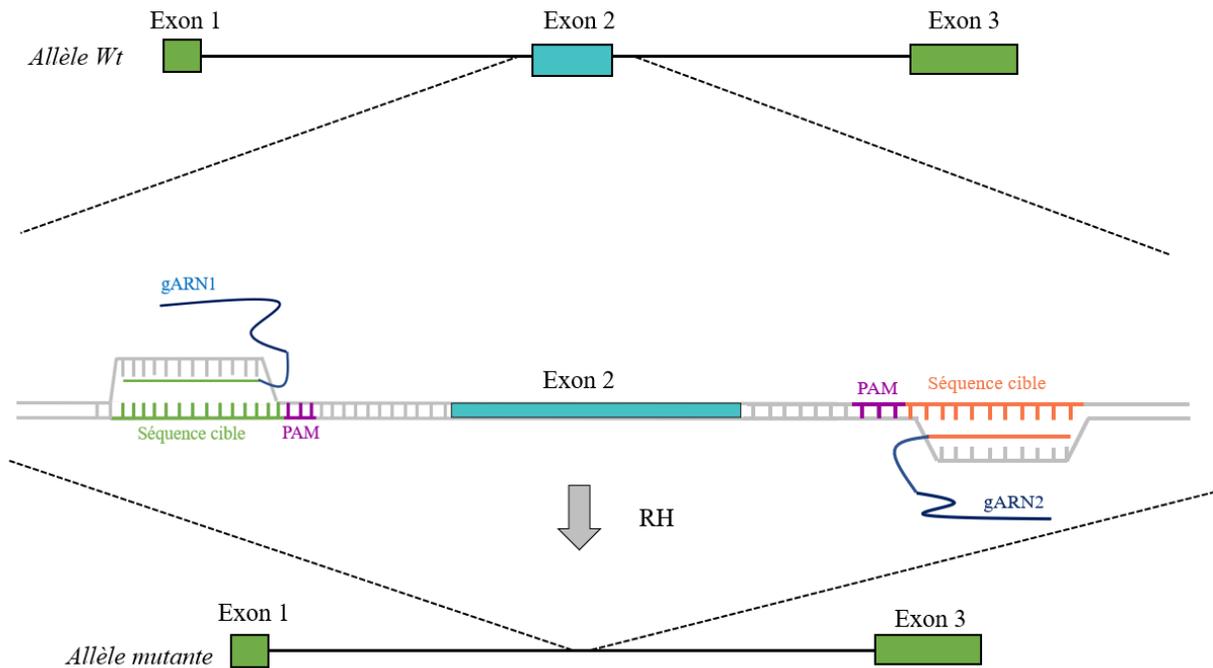


Figure 11. Stratégie CRisPR-cas9 pour la création de la lignée *Otp*KO.

Représentation de l'allèle wt pour le gène *Otp*, comportant 3 exons (boîtes vertes pleines) et de l'emplacement des guides ARN (gARN) utilisés pour retirer l'exon 2. Allèle mutant pour le gène *Otp* généré par CRisPR-cas9. Les guides ont permis à Crisper-cas9 de couper en amont de 5 nucléotides du site Pam et de retirer l'exon 2 en entièreté. Il y a eu par la suite recombinaison homologue (RH) pour réparer les deux brins.

Embryons de souris

Une fois les embryons extraits de la mère sacrifiée par dislocation cervicale, ceux-ci sont mis sur glace jusqu'à hypothermie. Ensuite, une partie de tissu de chaque embryon est conservée pour génotypage. Les têtes des embryons ont été fixées dans la PFA 4% pendant 12h, puis transmis dans une solution de sucrose 30% pour 12h. Par la suite, les têtes d'embryons ont été incluses dans l'OCT sur glace sèche. Des coupes de 20µm ont été effectuées au cryostat à -17°C et récoltées sur des lames chargées positivement. Des embryons issus de ce croisement ont été sacrifiés à E12.5 et à E18.5.

Clonage de sonde de souris

Des amorces ont été créées pour encadrer les ADNc des sondes afin de pouvoir insérer un ADNc d'environ 1Kb dans un plasmide pTOPO (Cat. No. 450640 : Invitrogen) et pBSK. Les insertions se trouvant dans pBSK étaient déjà créés dans le laboratoire du Dr. Michaud, c'est-à-dire les sondes Ot, TRH et SS. Les plasmides ont ensuite été clonés dans des bactéries DH5 et celles-ci ont été étalées sur des pétris dans un milieu avec LB + agarose + ampicilline, puis laissée 12h à 37 degrés. Les colonies ont été piquées, multipliées dans un milieu LB avec l'antibiotique ampicilline. Le tout a été centrifugé et les plasmides purifiés selon les directives du kit (Cat. No. BS1649 ; Bio Basic). Une PCR a ensuite été effectuée sur le plasmide avec les amorces SP6/T7 ou T7/T3 selon le plasmide correspondant, mis sur gel, purifiée à l'aide du kit "EZ-10 Spin column DNA Gel Extraction" de Biobasic (Cat.No. BS353 ; BioBasic) quantifié au nanodrop et séquencé par Génome Québec. Une fois séquencé, il a été possible de déterminer si l'antisens de l'ADNc était en T7, SP6 ou T3 selon le plasmide d'appartenance. La transcription in vitro avec DIG-labeling mix et la précipitation des sondes ont été effectuées selon les directives du commerçant (Cat. No. AM1322 ; Thermo Fisher). La sonde a ensuite été mise sur gel dénaturant à 1% agarose pour vérifier sa présence et sa taille. Un dot blot a été effectué avec un anticorps anti-DIG afin de vérifier le marquage de la sonde.

Des amorces ont été construites de sorte à encadrer le gène Otp à partir de tissu du cerveau de souris pour obtenir l'ADNc. Cet ADNc a été inséré dans le plasmide TOPO et sous cloné dans des bactéries selon les instructions du commerçant (Cat. No. 450640 ; Thermofishier). Après séquençage, ce cDNA a été amplifié par PCR et une transcription in vitro a pu être faite dans le but

d'obtenir une sonde d'ARN antisens. Les plasmides pour POU3f2, Sim1, Trh, Crh, SS et Ot étaient déjà disponibles pour effectuer une transcription in vitro.

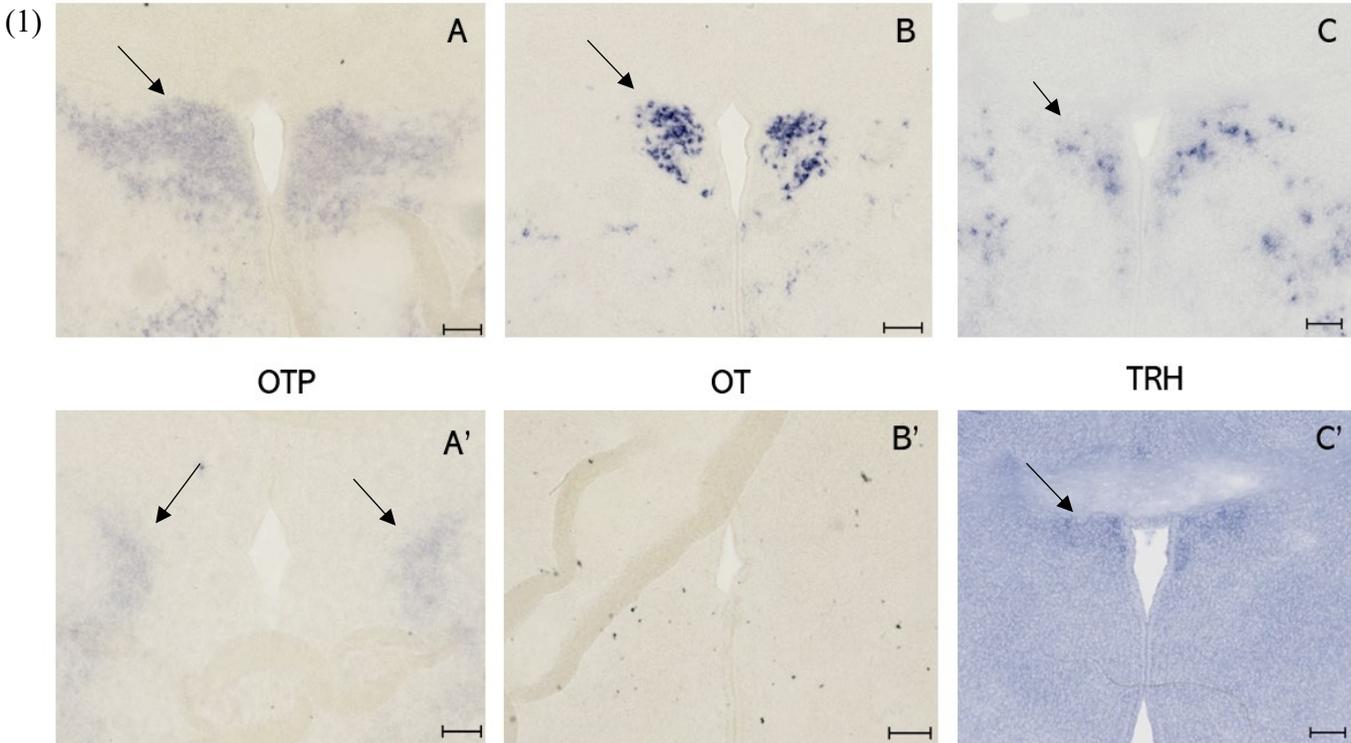
Hybridation In Situ

Les tranches de cerveaux d'embryons (E 18.5) ont été conservées à -20°C, puis décongelées à température pièce pendant 1h. Les sondes ont été mises dans un tampon d'hybridation (sels 10X 1%, 50% formamide, 25% Dextran 40%, 1mg/ml ARN Torula, 0,2% Denhardt's 50X) et chauffées à 65°C pendant 10min avant d'être mises sur les coupes provenant de la même portée. Les coupes avec les sondes ont été couvertes par des lamelles et mises au four à 65°C pendant 12h dans une chambre humide (solution de lavage au fond). Les tranches sont ensuite trempées dans une solution de lavage (1% SSC, 0,1% Tween, 50% formamide) déjà à 65°C pendant 15min pour faciliter le décollement des lamelles sans endommager les tranches. Les tranches ont ensuite subi deux lavages de 30min chacun à 65°C dans une solution de lavage. Ensuite, deux lavages au MABT 1X de 30min chacun à température pièce suivent. Les tranches sont couvertes d'une solution de blocage (2% BSA, 20% HISS, 1X MABT) pour 1h à 4°C avant d'ajouter l'anti-DIG (Cat.No.11093274910 ; Roche) pour au moins 1h à 4°C. Par la suite, 4x lavages de MABT 1X de 30min chacun à température pièce sont effectués afin de mettre du BMPurple (Cat.No. 47770900 ; Roche) pendant 4 à 12h ou jusqu'à ce que le domaine d'intérêt soit révélé. Finalement, 3x lavages au PBS 1X avec eau DEPC de 5min chacun sont nécessaires avant de monter les lames avec du vectashield (Cat. No. H-1000 ; Bio Lynx.inc), des lamelles et sceller avec du vernis à ongles transparents. Les expériences d'hybridation in situ ont été réalisées au moins en triplicata. Le triplicata signifie que ces expériences ont été répétées au moins trois fois sur des animaux différents à chaque fois. Les comparaisons par paires a été performée sur des animaux qui faisaient partie de la même portée pour éviter le plus possible des variations entre les portées.

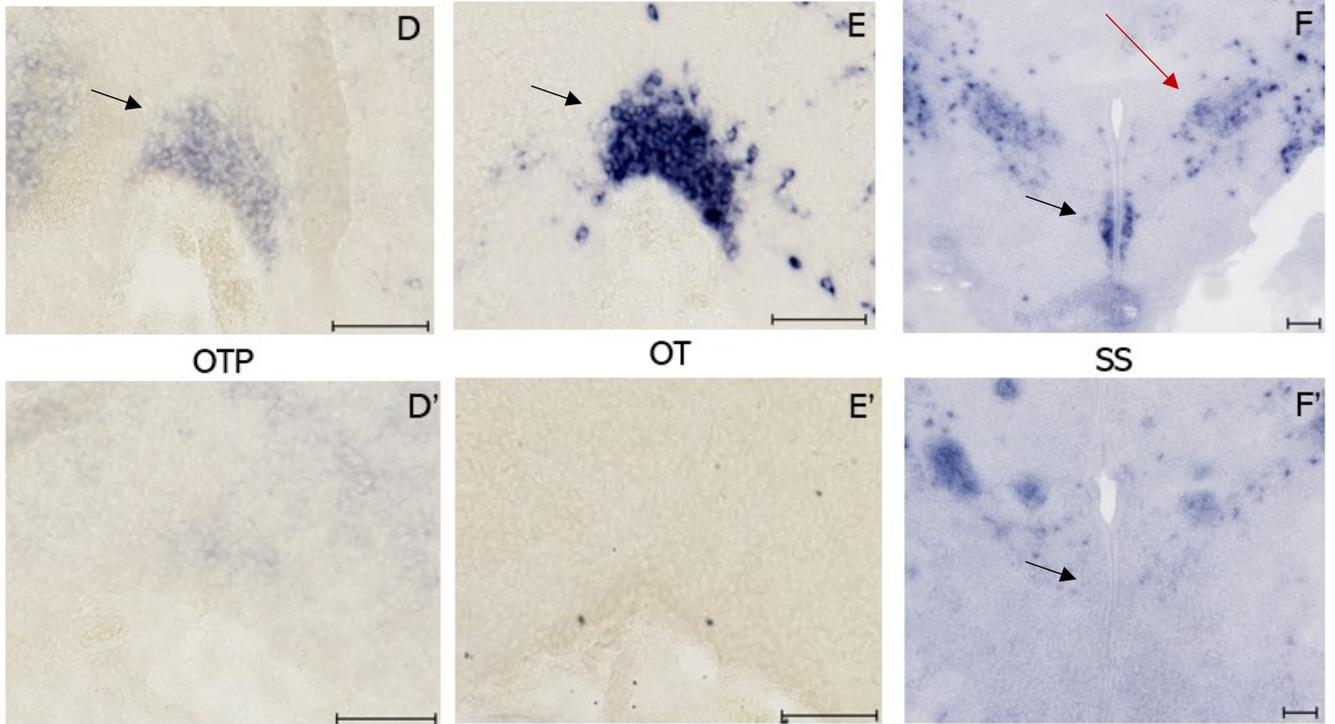
Immunohistochimie

Les tranches de cerveaux d'embryons (E 18.5) ont été conservées à -20°C, puis décongelées à température pièce pendant 1h. Les tranches ont d'abord été bloquées avec une solution (PBS 1X, NGS 10%, Triton 10%) et laissé à température pièce pour 1h30. Elles ont ensuite été rincées avec du PBS 1X pendant 5min avant d'être exposé à l'anticorps primaire de lapin α vasopressine (Peninsula laboratories T-4563) à dilution 1 :1000 dans une solution (PBS 1X, NGS 5%, Triton 0,1%) et laissé à 4°C 12h. Ces tranches ont été lavées avec du PBS 1X 3 x 10min. Les tranches ont

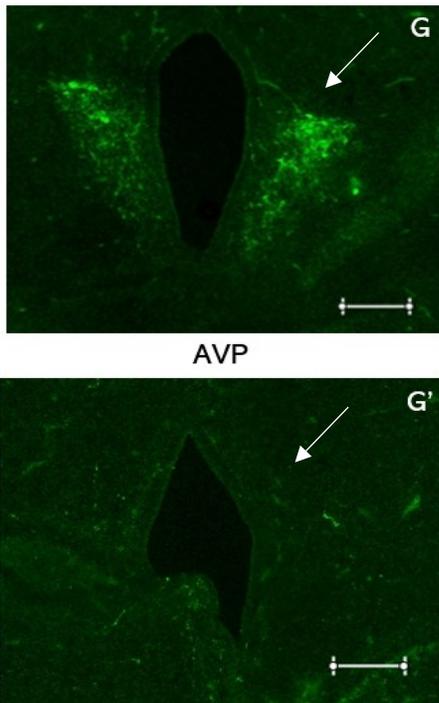
été exposées à l'anticorps secondaire de chèvre α lapin (Alexafluor™ 488) dans une dilution de 1:1000 dans une solution comme dans le cas de l'anticorps primaire pendant 12h. Les tranches ont été rincées avec du PBS1X 3 x 10min, puis montées avec du vectashield (Cat. No. H-1000 ; BioLynx.inc) avec des lamelles et scellées avec du vernis à ongle transparent.



(2)



(3)



(4)

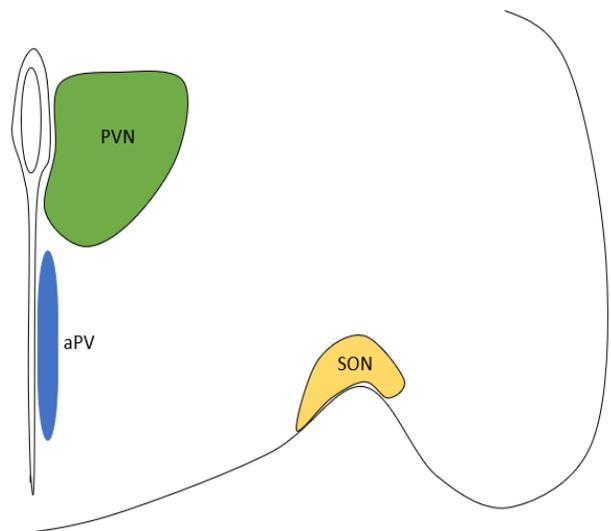


Figure 12. Hybridation In Situ et immunofluorescence de l'hypothalamus avec les marqueurs Otp, Ot, Trh, SS et AVP chez les souris E18.5 sauvages et Otp^{-/-}.

Les hypothalamus sauvages (A-G) sont comparés aux hypothalamus des embryons de souris ayant pour génotype Otp^{-/-} (A'-G'). Les barres de mesures correspondent toutes à 100µm. (1) Le PVN (flèches noires A-C et A'-C') est marqué par les sondes d'OTP (A), la sonde OT (B) et la sonde TRH (C) chez l'embryon sauvage, puis chez l'embryon Otp^{-/-} (A'-C'). Le SON (2) est marqué par les sondes OTP (D) et OT (E). L'aPV (flèche noire F-F') est marqué par la sonde SS (F). On peut voir les effets engendrés par la perte de fonction d'OTP sur l'expression de ces marqueurs au niveau du SON (flèches noires) (D'-E') et sur l'aPV (F'). (3) Le PVN (flèche blanche G) est marqué en immunofluorescence pour l'AVP (G-G') chez l'hypothalamus prospectif. (4) Schéma des différents noyaux marqués par les hybridations in situ et les immunofluorescences : PVN (vert), aPV (bleu) et SON (jaune).

Résultats et discussion

Génération de l'allèle Otp^-

Nous avons obtenu une seule souris fondatrice porteuse de la délétion de l'exon 2. Plus spécifiquement, la caractérisation par séquençage de l'allèle (Otp^-) a montré la présence d'une délétion de 355 pb qui ne se traduit pas un changement de cadre de lecture et l'introduction prématurée d'un codon d'arrêt de la traduction. Cette souris a transmis la délétion à la génération suivante et une lignée a pu être établie par des croisements successifs avec des souris C57BL/6J sur plus de 3 générations. La structure de la protéine produite a été mise en relief par le SWISS-MODEL. Bien que certaines structures de la protéine aient été traduites, l'homéodomaine a été retiré avec l'exon 2, ne lui permettant pas d'effectuer son rôle en tant que facteur de transcription. Pour s'assurer qu'une telle protéine soit effectivement produite chez les animaux mutants, un test de détection de protéine tronquée (PTT) peut être effectué (Roest, Roberts et al. 1993). Une protéine tronquée pourrait avoir des répercussions négatives indépendantes de la mutation d'origine de l'exon 2. D'autres expériences seront nécessaires afin de démontrer hors de tout doute que la protéine tronquée ne paralyse pas le bon fonctionnement cellulaire.

Le génotypage à 3 semaines de vie de souris (plus de 100 souris) issues d'un croisement entre souris $Otp^{+/-}$ a montré l'absence de souris homozygotes. Cependant, nous avons observé un ratio mendélien des différents génotypes à E18,5 (En croisant deux souris hétérozygotes pour le gène Otp , nous nous attendions à ce que les souris homozygotes ne survivent pas après la naissance. Aucune souris homozygote n'est née de nos croisements. Nous voulions cependant nous assurer que la transmission de notre mutation se fait de façon mendélienne à l'état embryonnaire, c'est-à-dire en obtenant dans une portée 25% de wt, 50% het et 25% homozygote. Nous avons génotypé à l'aide d'une extraction de l'ADN à partir de tissu et de deux PCR consécutives, l'une encadrant le gène Otp et l'autre encadrant l'exon 2 retiré par CRISPR. La distribution des génotypes des embryons récoltés est de 21% de wt, 55% hétérozygotes et 24% homozygotes. Ces observations indiquent que les souris homozygotes meurent entre la naissance et 3 semaines de vie, comme il a été rapporté pour les autres allèles nuls d' Otp (Acampora, Postiglione et al. 1999, Wang and Lufkin 2000).

Hybridation *in situ* et immunofluorescence

L'ARNm antisens d'Otp marque le PVN de chaque côté du 3^e ventricule chez la souris sauvage, tandis que, chez l'homozygote, le domaine d'expression d'Otp a disparu (Fig. 12, A-A'). Par contre, un marquage en C inversé est observable de chaque côté du 3^e ventricule (Fig. 12, A-A'). Ce patron d'expression chez Otp^{-/-} a été préalablement observé chez des embryons mutant de *Sim1* à E18.5 (Caqueret, Boucher et al. 2006). Il a été suggéré que ce patron d'expression témoigne d'un défaut de migration des cellules prospectives du PVN. Nos résultats suggèrent qu'en l'absence d'Otp, les cellules prospectives du PVN ne migrent pas correctement, tout comme en l'absence de *Sim1*. Ce patron d'expression en C inversé chez les deux types d'homozygotes renforce l'idée selon laquelle la perte de fonction de l'un des deux facteurs de transcription a les mêmes conséquences. Ensuite, les marqueurs OT, AVP et TRH sont absents du PVN chez les embryons homozygotes (Fig.12, B-B',C-C' et G-G') et cela correspond à ce que nous trouvons dans la littérature chez l'homozygote de *Sim1* et d'*Arnt2* (Michaud, Rosenquist et al. 1998, Michaud, DeRossi et al. 2000) et les homozygotes des autres allèles nuls d'Otp (Acampora, Postiglione et al. 1999, Wang and Lufkin 2000). On voit aussi l'absence de l'expression de marquage du SON autant pour Otp (Fig. 12, D') que pour OT (Fig.12, E') et AVP (non-montré) dans le SON, ce qui correspond à la perte de fonction d'OTP au phénotype observé chez les autres lignées mutantes d'Otp. De plus, on note une absence d'expression de *Ss* dans la région de l'APV des embryons Otp^{-/-} comme il a aussi été rapporté pour d'autres lignées mutantes d'Otp (Acampora, Postiglione et al. 1999). Pour ce qui est du marqueur CRH, l'hybridation *in situ* a été tentée à plusieurs reprises en modifiant la température d'hybridation sans avoir de signal. Une immunofluorescence a alors été envisagée, tout comme cela a été le cas pour AVP. Cette immunofluorescence n'a malheureusement pas été optimisée à temps pour la rédaction de ce mémoire. En conclusion, la caractérisation du génotype de notre lignée OTPKO a été faite et correspond à d'autres lignées de la littérature qui portent une perte de fonction d'OTP. La perte de fonction d'OTP chez l'homozygote montre un patron d'expression qui ressemble à celui de *Sim1*, suggérant qu'il ait un rôle similaire dans la migration appropriée des cellules prospectives du PVN et du SON. Cet aspect consolide davantage l'idée de formation d'un complexe protéique par OTP et *Sim1*, mais il ne s'agit pas d'une preuve directe. Étant donné que de bons anticorps n'existent pas contre *Sim1*, une façon de contourner le problème serait d'insérer le transcrite de *Sim1* dans un plasmide contenant un tag pouvant être reconnu par un anticorps.

En conclusion, la caractérisation du génotype de notre lignée OTPKO a été faite et correspond à d'autres lignées de la littérature qui portent une perte de fonction d'OTP. La perte de fonction d'OTP chez l'homozygote montre un patron d'expression qui ressemble à celui de Sim1, suggérant qu'il ait un rôle similaire dans la migration approprié des cellules prospectives du PVN et du SON. Cette observation consolide l'idée d'une interaction entre OTP et SIM1.

CHAPITRE 3 : Interactions entre les facteurs de transcription SIM1 et OTP

Introduction

Afin d'explorer la possibilité d'une interaction fonctionnelle entre SIM1 et OTP, nous avons cherché à déterminer si les souris hétérozygotes *Otp* développent une obésité associée à une hyperphagie comme c'est le cas pour les souris hétérozygotes *Sim1* et si les souris doublement hétérozygotes (*Sim1*^{+/*tlz*+ *Otp*^{+/-}}) sont plus obèses que les souris *Sim1*^{+/*tlz*+ (hétérozygote)}. Une interaction fonctionnelle directe entre ces deux facteurs de transcription n'a pas été démontrée dans ce chapitre. Nous avons plutôt observé si le fait de porter les deux mutations avaient un effet de synergie sur l'équilibre énergétique.

Matériel et méthodes

Animaux

Les souris des lignées *Otp*^{+/-} et *Sim1*^{+/*tlz*} (Marion et al., 2005) ont été maintenues sur un background C57BL/6. Un croisement entre une souris *Otp*^{+/-} et une souris *Sim1*^{+/*tlz*+ (hétérozygote)} a été effectué, de sorte à obtenir les quatre génotypes suivants dans la même portée : wt, *Otp*^{+/-}, *Sim1*^{+/*tlz*+ , *Otp*^{+/-}*Sim1*^{+/*tlz*+ . Le génotypage a été effectué à partir de tissu provenant des souriceaux et à l'aide d'une PCR comme cela a été décrit dans le chapitre 2 pour *Otp* et dans Marion et al. (2005) pour *Sim1*. Les souriceaux issus de ces croisements sont restés avec leur mère pendant 21 jours avant d'être sevrés. Ils ont été alimentés à la diète Teklad Global contenant 19% de protéines (Irradiée, Envigo #2919) et 9% de matières grasses dans la cage avec leur mère en laissant quelques croquettes au fond de la cage. Une fois les 21 jours atteints, les souriceaux sont mis dans une cage avec de la nourriture grasse uniquement (9% de matières grasses), température de 22°± 2 avec un cycle de jour/nuit de 12h. Les souriceaux ont un libre accès à la nourriture.}}

Pesée

Les souriceaux ont été pesés une fois par semaine à partir du moment où ils ont atteint 5 semaines de vie jusqu'à l'âge de 6 mois. Pour éviter les variations de poids de chaque souris au cours de la journée, la pesée a eu lieu le même jour à la même heure à chaque semaine.

Analyse des masses

Les masses des souris des deux sexes ont été analysées séparément. Une ANOVA à un facteur avec mesures répétées a été effectuée. Une correction de Bonferroni a été effectuée pour déterminer à partir de quel âge une différence statistiquement significative est observée.

Mesure de l'apport alimentaire

Les souris d'une même portée ont été génotypées et mises dans une cage avec des souris du même génotype et du même sexe. Elles ont un accès libre à la nourriture grasse sauf durant une période de 24h durant laquelle une quantité pré mesurée et pesée est distribuée dans les cages. La quantité de nourriture fournie pendant ces 24h était nettement supérieure à leur apport alimentaire quotidien : de 100 à 200g de nourriture était à leur dispositions. Une fois les 24 heures écoulées, la masse des croquettes restant est calculée. Le fond de la cage et le nid est investigué pour vérifier des restants de croquettes non finis. Le tout est remis dans le compartiment destiné à la nourriture. Les souris ont ensuite un accès libre à une quantité amplement suffisante de nourriture (100-200g). La mesure de l'apport alimentaire a débuté à l'âge de 8 semaines jusqu'à l'âge de 15 semaines, de sorte à encadrer la période durant laquelle un changement dans la masse des souris est notable.

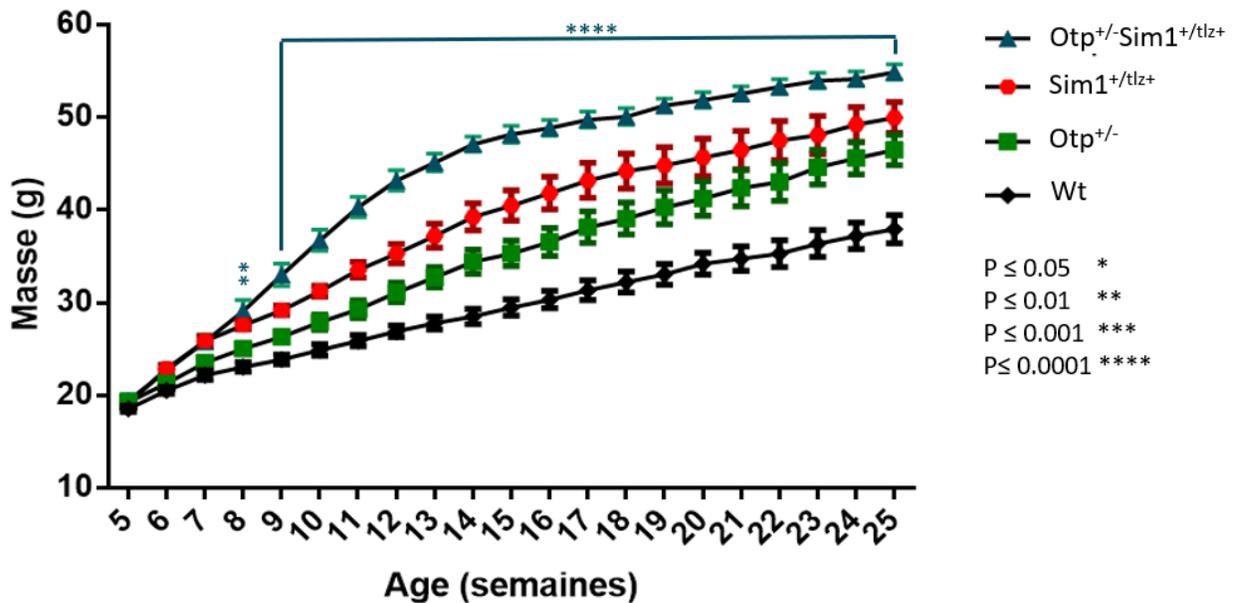


Figure 13. Évolution de la masse des souris mâles $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$ et sauvages.

Les souris mâles $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz}$ (turquoise) sont comparés aux souris sauvages (Wt, noir). Les souris ont été sevrées à partir de 21 jours et mis sur une diète grasse (9% de gras). Chez les souris mâles, (n=13 wt, n=8 $Otp^{+/-}$, n=12 $Sim1^{+/tlz+}$ et n=12 $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$). Une Anova à un facteur avec mesures répétées a été performée, suivi d'une correction de Bonferroni. Les barres d'erreurs représentent le SEM (erreur standard à la moyenne).

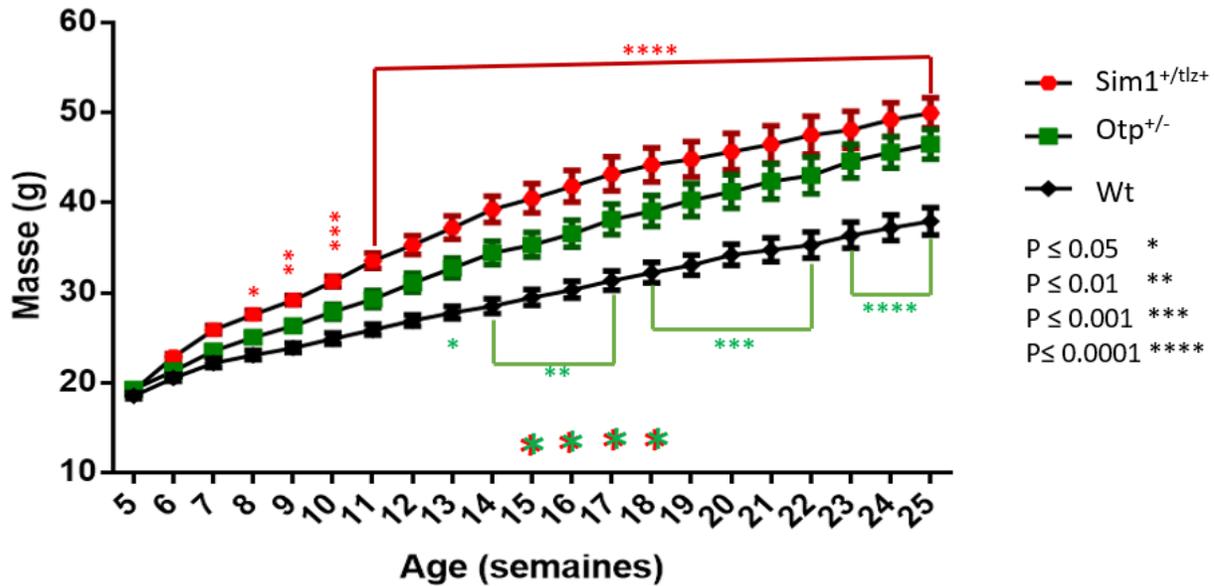


Figure 14. Comparaison de la masse des souris mâles mutantes $Otp^{+/-}$ (vert) et $Sim1^{+/tlz+}$ (rouge) aux souris sauvages (wt, noir).

Les souris $Otp^{+/-}$ (vert) et $Sim1^{+/tlz+}$ (rouge) sont comparées aux WT et entres elles. Les souris $Sim1^{+/tlz+}$ sont comparées au souris sauvages (étoiles rouge), puis les souris $Otp^{+/-}$ sont comparées aux souris sauvages (étoiles verte). Les étoiles de couleurs rouge et verte représentent une différence entre les deux génotypes mutants. Les souris ont été sevrées à partir de 21 jours et mis sur une diète grasse (9% de gras). Chez les souris mâles, (n=13 wt, n=8 $Otp^{+/-}$, n=12 $Sim1^{+/tlz+}$ et n=12 $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$). Une Anova à un facteur avec facteur répétées a été performé avec correction de Bonferroni. Les barres d'erreurs représentent le SEM.

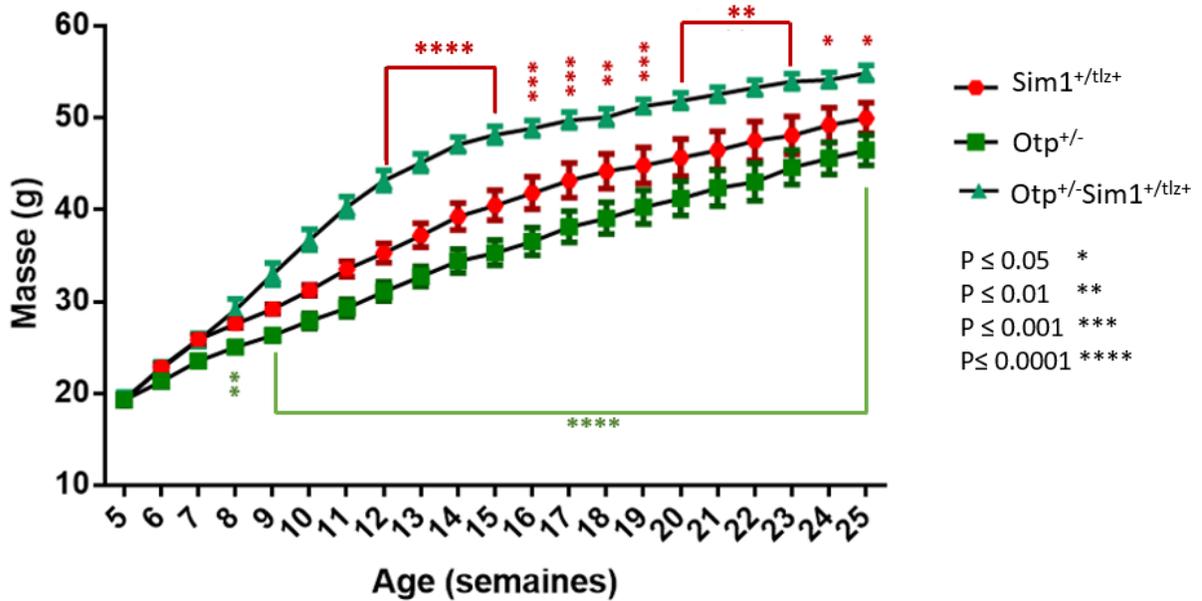


Figure 15. Évolution de la masse des souris mâles mutantes Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+} (turquoise) Otp^{+/-} (vert) et Sim1^{+/tlz+} (rouge).

Les souris Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+} (turquoise) sont comparées aux souris Otp^{+/-} (vert) et Sim1^{+/tlz+}. Les souris ont été sevrées à partir de 21 jours et mis sur une diète grasse (9% de gras). Chez les souris mâles, (n=13 wt, n=8 Otp^{+/-}, n=12 Sim1^{+/tlz+} et n=12 Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}). Une Anova à un facteurs avec mesures répétées a été performé avec correction de Bonferroni. Les barres d'erreurs représentent le SEM.

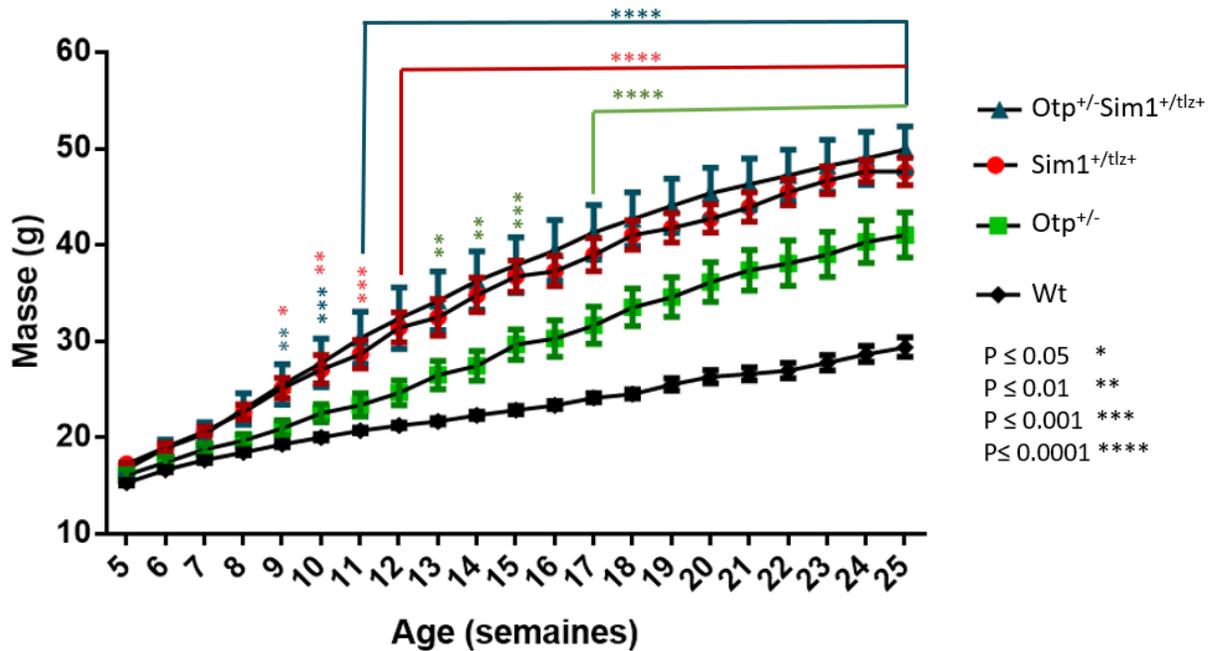


Figure 16. Évolution de la masse des souris femelles wt , $Otp^{+/-}$, $Sim1^{+/tlz+}$ et $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$

Les souris $Otp^{+/-}$ (vert), $Sim1^{+/tlz+}$ (rouge) et $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$ (turquoise) sont comparées aux souris Wt (noir). Chez les souris femelles, ($n=20$ Wt , $n=12$ $Otp^{+/-}$, $n=6$ $Sim1^{+/tlz+}$ et $n=7$ $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$). Une Anova à un facteurs avec mesures répétées a été performée avec correction de Bonferroni. Les barres d'erreurs représentent le SEM.

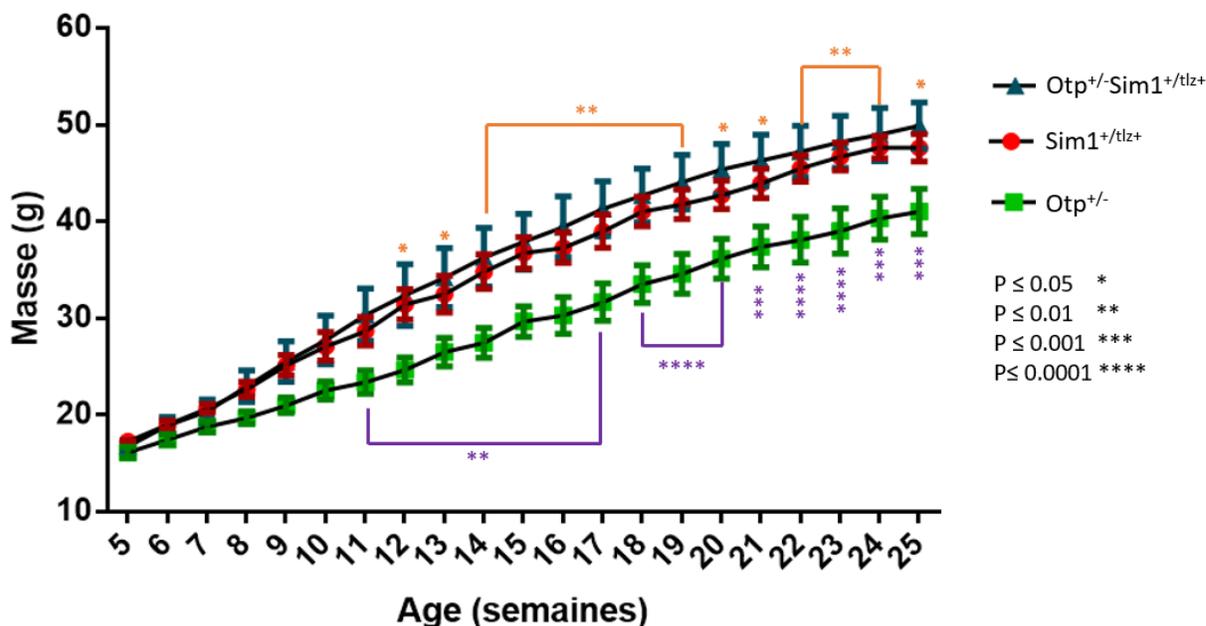


Figure 17. Comparaison de la masse des souris femelles mutantes Otp^{+/-}, Sim1^{+/tlz+} et Otp^{+/-} Sim1^{+/tlz+} des souris sauvages.

Les étoiles de couleurs rouge et verte représentent une différence entre les deux génotypes mutants. Les étoiles de couleurs simple (rouge ou verte) représentent une différence statistique entre le mutant correspondant et les souris de type sauvage. Les souris ont été sevrées à partir de 21 jours et mis sur une diète grasse (9% de gras). Chez les souris femelles, (n=20 Wt, n=12 Otp^{+/-}, n= 6 Sim1^{tlz+/-} et n=7 Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}). Une Anova à un facteurs avec mesures répétées a été performé avec correction de Bonferroni. Les barres d'erreurs représentent le SEM.

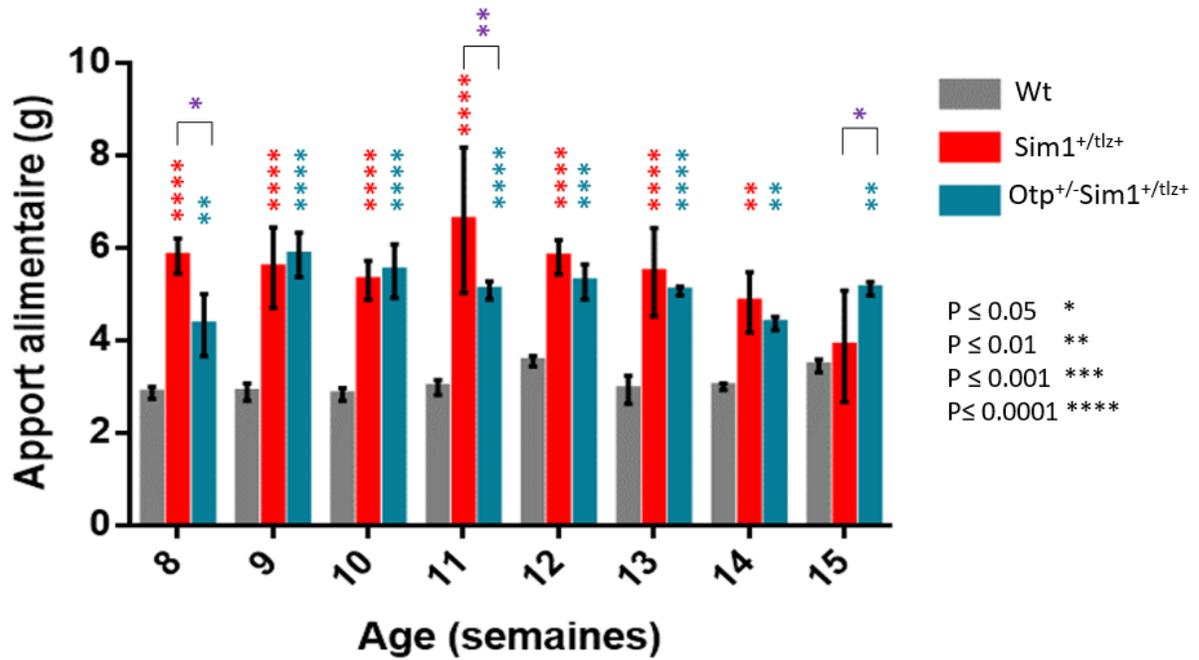


Figure 18. Apport alimentaire des souris mâles wt, Sim1^{+/tlz+} et Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}.

Les souris mâles sont comparées dans leur apport alimentaire (wt : n=6, Sim1^{+/tlz+} : n=5, Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+} : n=6). Une Anova à un facteur avec mesures répétées a été performée avec correction de Bonferroni. Les barres d'erreurs représentent le SEM. Les étoiles rouges (*) indiquent une différence significative de masse entre les souris Sim1^{+/tlz+} et les souris sauvages. Les étoiles bleues (*) indiquent une différence significative de masse des souris Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+} par rapport aux souris sauvages. Les étoiles mauves (*) indiquent une différence de masse entre les groupes des mutants.

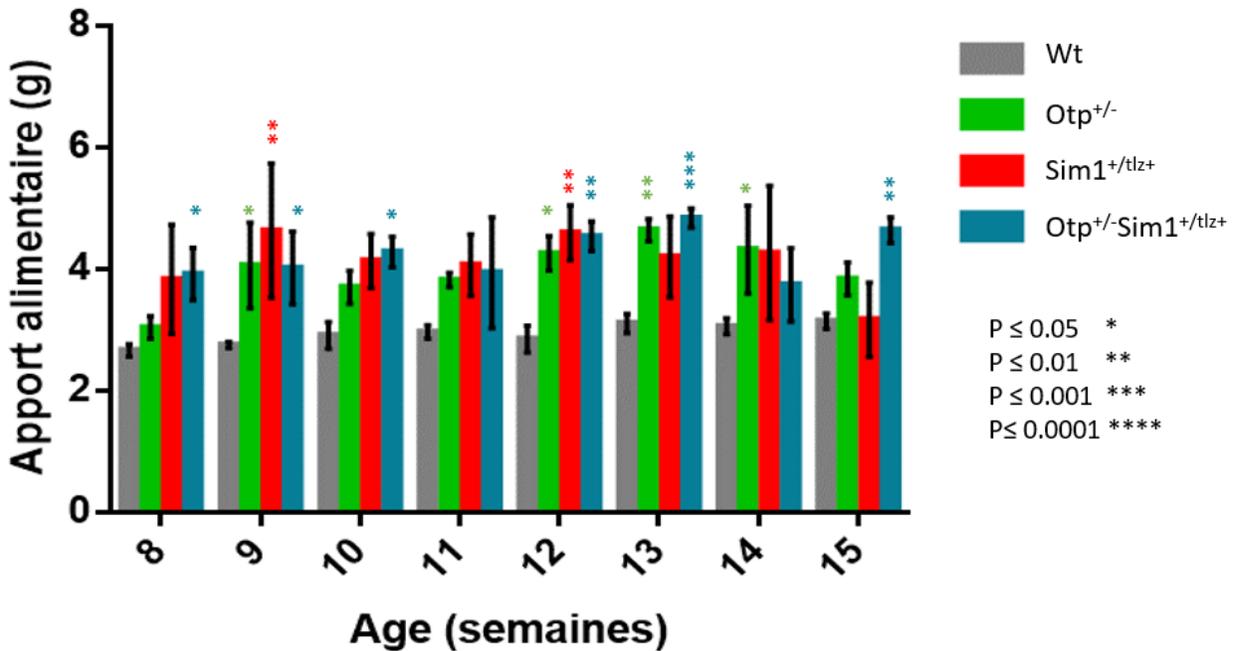


Figure 19. Apport alimentaire chez les souris femelles.

Les souris femelles sont comparées. Les souris ont été sevrées à partir de 21 jours et mis sur une diète grasse (9% de gras). Chez les souris femelles, (wt, n=12 Otp^{+/-}, n= 5 Sim1^{+/-tlz+} et n=3 Otp^{+/-} Sim1^{+/-tlz+}-n =5. Une Anova à un facteur avec mesures répétées a été performée avec correction de Bonferroni. Les barres d'erreurs représentent le SEM. Les étoiles vertes (*) correspondent à une différence significative de masse des souris Otp^{+/-} par rapport aux souris sauvages. Les étoiles bleues (*) et (*) correspondent à des différences significatives de masse des groupes de souris sauvages par rapport aux souris Otp^{+/-} Sim1^{+/-tlz+} et aux souris Sim1^{+/-tlz+} respectivement.

Résultats

La mesure des masses chez les souris a été effectuée jusqu'à 25 semaines de vie et toutes les souris sont issues d'un croisement entre une souris $Sim1^{tlz+/-}$ et d'une souris $Otp^{+/-}$. Le but de ce croisement était d'obtenir tous les génotypes mutants et le génotype sauvage (wt) dans une même portée afin de déterminer si les mutants portant les deux mutations ont une masse plus importante que les mutants $Sim1^{tlz+/-}$ et $Otp^{+/-}$. Si tel est le cas, cela suggère une interaction entre les deux facteurs de transcription. Pour les tests statistiques, les souris femelles et les souris mâles ont été séparées d'emblée étant donné que leur poids diffère déjà à un génotype sauvage. L'évolution du gain de masse est illustrée pour les quatre génotypes (Fig.13 chez les mâles, Fig.16 chez les souris femelles).

Masse des souris mâles

Une Anova à un facteur avec mesures répétées a été effectuée avec les mêmes souris pesée une fois par semaine jusqu'à ses 25 semaines. D'abord, les souris $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$ ont une masse nettement plus importante que les souris de type sauvage ($p = 0.0012$) dès la 8^{ème} semaine de vie (Fig. 13). Les souris $Sim1^{+/tlz}$ commencent aussi à montrer un gain pondéral supérieur à celui des souris sauvages ($p = 0.03$) (Fig. 14), ce qui n'est pas le cas pour les souris $Otp^{+/-}$ jusqu'à atteindre la 13^{ème} semaine ($p = 0.04$) (Fig.14). Nous nous sommes demandé si l'effet du gain de masse des souris qui portent la mutation $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$ est causé par l'effet de la mutation $Sim1$. Cependant, une différence significative est visible (Fig. 15) dès la 10^{ème} entre les $Sim1^{tlz/+}$ et les souris $Otp^{+/-}Sim1^{tlz/+}$ ($p = 0.005$), puis cette différence est hautement significative à la 12^{ème} semaine ($p < 0.0001$). Une différence marquée est également visible entre les souris $Otp^{+/-}$ et les souris $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$ dès la 9^{ème} semaine ($p = 0.002$), puis est hautement significative à partir de la 10^{ème} semaine ($p < 0.0001$). Entre les semaines 15 et 18 (Fig.15), une petite différence significative est notée entre la masse des souris $Otp^{+/-}$ et les souris $Sim1^{+/tlz+}$ ($p = 0.03$ à 15^{ème} semaine), ($p = 0.03$ à la 16^{ème} semaine), ($p = 0.04$ à la 17^{ème} semaine) et ($p = 0.04$ à la 18^{ème} semaine). Après la 18^{ème} semaine, la différence de masse entre les souris $Otp^{+/-}$ et les souris $Sim1^{+/tlz+}$ n'est pas significative.

Masse des souris femelles

Une Anova à un facteur a été effectuée avec mesures répétées pour une même souris pesée une fois par semaine jusqu'à ses 25 semaines. D'abord, les souris $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$ sont plus lourdes que les

souris de type sauvage dès la 9^{ième} semaine ($p = 0.009$) (Fig.16). Cette différence s'accroît de façon hautement significative à la 11^{ième} semaine ($p < 0.0001$). Les souris Sim1^{+/tlz+} sont plus lourdes que les souris sauvages dès la 9^{ième} semaine ($p = 0.03$) (Fig.16) et cette différence devient hautement significative à partir de la 12^{ième} semaine ($p < 0.0001$). Les souris Otp^{+/-} sont plus lourdes que les souris sauvages à partir de la 13^{ième} semaine ($p = 0.02$) et cette différence est hautement significative à partir de la 17^{ième} semaine ($p < 0.0001$). Il y a par la suite une différence significative entre la 12^{ième} semaine et la 25^{ième} semaine pour les souris Otp^{+/-} comparativement aux souris sauvages (Fig.16). Il y a une différence significative entre les souris Otp^{+/-} et les souris Otp^{+/-} Sim1^{+/tlz+} à partir de la 11^{ième} semaine ($p = 0.006$) (Fig.17) et devient hautement significative à partir de la 16^{ième} semaine ($p < 0.0001$). Il n'y a aucune différence significative entre les souris Sim1^{+/tlz+} et les souris Otp^{+/-} Sim1^{+/tlz+} (Fig.17).

Apport alimentaire chez les souris mâles

Le but de cette partie du projet était de confirmer le phénotype que nous soupçonnions, c'est-à-dire de confirmer si la masse plus importante des souris Otp^{+/-} et Otp^{+/-} Sim1^{tlz+/-} est dû à un plus grand apport alimentaire. Pour ce faire, les données préliminaires de la prise de masse ont laissé voir une tendance à la prise de masse plus importante entre les semaines 8 et 15. Nous n'avons obtenu qu'un mâle Otp^{+/-}, c'est pourquoi une Anova à deux facteurs avec mesures répétées a été performée sur seulement 3 groupes, c'est-à-dire les souris Wt, Sim1^{+/tlz+} et Otp^{+/-} Sim1^{tlz+/-}. À la 8^{ième} semaine, une différence significative entre les Wt et les Sim1^{+/tlz+} est observable ($p < 0.0001$) (Fig.18), tout comme pour les Otp^{+/-} Sim1^{+/tlz+} (8^e $p=0.0044$). Les différences entre les Wt et les Sim1^{+/tlz+} sont très significatives de la 8^{ième} à la 14^{ième} semaine (8^e-14^e semaine, $p < 0.0001$) et la même significativité est observable en comparant les Wt aux souris Otp^{+/-} Sim1^{+/tlz+} de la 8^e semaine à la 11^e semaine (8^e-11^e, $p < 0.0001$). Une différence significative est détectable à la 14^{ième} semaine ($p=0.0013$) entre les groupes Wt et Sim1^{+/tlz+}, puis cela devient non significatif à la 15^{ième} semaine ($p=0.6776$). Pour ce qui est de la comparaison entre les groupes Wt et Otp^{+/-} Sim1^{+/tlz+}, une différence est significative pour les semaines 12 à 15 (12^e $p=0.0007$, 13^e $p < 0.0001$, 14^e $p=0.0086$, 15^e $p=0.001$). Il existe des différences significatives entre les souris Sim1^{+/tlz+} et Otp^{+/-} Sim1^{+/tlz+} à la 8^{ième} semaine ($p=0.0107$) et à la 11^{ième} semaine ($p=0.0092$) où les souris Sim1^{+/tlz+} ont un apport alimentaire plus important. À la 15^{ième} semaine ($p=0.0407$), ce sont les souris Otp^{+/-} Sim1^{+/tlz+} qui

ont un apport alimentaire plus important, cependant cela peut être dû à un apport alimentaire très bas d'une souris $Sim1^{+/tlz+}$.

Apport alimentaire chez les souris femelles

Nous avons choisi la même fenêtre temporelle que les souris mâles pour la pesée de l'apport alimentaire. Dans cette situation, tous les groupes mutants sont présents. Une Anova à deux facteurs avec mesures répétées a été effectuée avec correction de Bonferroni. Les souris $Otp^{+/-} Sim1^{+/tlz+}$ ont un apport alimentaire significativement plus grand que les souris Wt pour chaque semaine (8^e p=0.032, 9^e p=0.03, 10^e p=0.012, 12^e p=0.0012, 13^e p=0.0008, 15^e p=0.0056) à l'exception de la semaine 11 (p=0.12) et 14 (p=0.77) (Fig.19). Pour ce qui est des souris $Otp^{+/-}$, leur apport alimentaire est plus important que les Wt (9^e p=0.0223, 12^e p=0.0108, 13^e p=0.0043, 14^e p=0.0308) sauf pour les semaines 8, 11 et 15 (8^e p > 0.9999, 10^e p=0.466, 11^e p=0.3382, 15^e p=0.7085) où la différence n'est pas significative, bien qu'une tendance à la hausse soit visible. Pour les souris $Sim1^{+/tlz+}$, il y a une différence significative dans l'apport alimentaire pour les semaines 9 et 12, (9^e p=0.0037, 12^e p=0.0085) tandis qu'une tendance à la hausse est visible pour les autres semaines (8^e p=0.189, 10^e p=0.1477, 11^e p=0.2563, 13^e p=0.2667, 14^e p=0.1585, 15^e p > 0.9999). On voit aussi également beaucoup de variabilité dans l'apport alimentaire chez les souris femelles. Toutes ces données suggèrent qu'un nombre plus grand de souris permettrait de confirmer les tendances et de voir les différences plus subtiles entre chaque génotype mutant.

Discussion

Chez les souris mâles

Notre but avec ces expériences était de voir si nous pouvions confirmer le phénotype d'obésité chez le mutant Otp et si une double mutation cause une obésité plus importante qu'une seule mutation. Chez les souris mâles, les souris ayant pour génotype $Otp^{+/-} Sim1^{+/tlz+}$ sont significativement plus obèses que les souris $Sim1^{+/tlz+}$, ce qui sous-entend que la double mutation est plus handicapante. Une de nos hypothèses était que $Sim1$ et Otp font partie d'un même complexe protéique et agissent ensemble sur d'autres facteurs de transcriptions. Autrement dit, si le bon fonctionnement du complexe protéique est affecté par la mutation de l'un des deux facteurs de transcription, la mutation des deux facteurs de transcriptions ne devrait pas handicaper la fonction du complexe protéique davantage. Cependant, les résultats suggèrent que la double

mutation est beaucoup plus handicapante. Aussi, une différence significative est observable entre les mutants $Otp^{+/-}$ et $Sim1^{+/tlz+}$ pendant une courte période, c'est-à-dire de la semaine 15 à 18. Cela suggère d'abord que les deux mutations seules sont aussi handicapantes l'une que l'autre et que la différence peut être dans la façon dont les souris engraisent. En effet, les souris mutantes pour $Sim1$ sont significativement plus obèses que les souris wt dès la 8^{ème} semaine, tandis que les souris Otp sont plus obèses que les wt dès la 13^{ème} semaine. Ces différences laissent sous-entendre que les deux mutations sont effectivement autant handicapantes l'une que l'autre, mais la façon dont elles affectent l'équilibre énergétique est différente. Une mutation faux-sens d' Otp avait été induite par un autre groupe de recherche pour mettre en relief l'obésité hâtive comparativement aux souris sauvages (à partir de la 7^{ème} semaine de vie chez le souris) (Moir, Bochukova et al. 2017). Leur mutation entraînant une accumulation de protéines handicapantes peu empirer l'obésité observée, ce qui expliquerait la détection de l'obésité chez notre lignée mutante un peu plus tardivement qu'à la 7^{ème} semaine. Si l'on prête attention à l'apport alimentaire, les souris $Sim1^{+/tlz+}$ et $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$ ont une quantité de nourriture ingérée plus importante que les souris wt. Cependant, une tendance se dessine sur la quantité de nourriture que les deux groupes mutants ingère et il semblerait que le souris $Sim1^{+/tlz+}$ ont un apport alimentaire plus important. Cependant, un nombre plus important de souris serait nécessaire pour répondre à cette question. Les données préexistantes dans la littérature suggèrent que la cause de l'obésité pour une souris portant une mutation du gène *Otp* serait par hyperphagie, comme ce l'est pour les souris mutantes de *Sim1* (Moir, Bochukova et al. 2017).

Chez les souris femelles

Le scénario est différent pour les femelles. En effet, il n'y a pas de différence de masse entre les souris $Sim1^{+/tlz+}$ et $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$. Les souris $Otp^{+/-}$ sont effectivement plus obèses que les souris Wt, cependant une différence significative existe également entre les souris $Otp^{+/-}$ et les souris $Sim1$. En effet, les souris $Otp^{+/-}$ sont obèses, mais la mutation pour ce facteur de transcription résulte en un phénotype moins handicapant. Si l'on observe l'apport alimentaire, il est à noter qu'un nombre de souris plus important pour mesurer l'apport alimentaire est nécessaire, puisque des tendances sont visibles pour l'instant. De façon intéressante, il n'y a pas de différence statistique entre les groupes mutants pour l'apport alimentaire. Une tendance se dessine pour ce qui est de l'apport alimentaire de chaque groupe : l'apport alimentaire est statistiquement plus important pour

les 3 groupes mutants que pour les wt. Il faudrait un nombre de souris plus important de souris pour déterminer des différences entre les trois groupes mutants.

Dimorphisme sexuel

Il n'a jamais été rapporté qu'un dimorphisme sexuel puisse exister au niveau développemental de l'hypothalamus. Cependant, il y a un dimorphisme dans un bon nombre de processus physiologiques en lien avec l'équilibre énergétique et le comportement en lien avec l'apport alimentaire. Par exemple, il a été démontré que les diètes riches en gras ont tendance à rendre les souris mâles plus obèses que les femelles (Wang, He et al. 2018). Il n'est pas à négliger que les hormones sexuelles sont également connues pour avoir une influence sur l'équilibre énergétique. De façon plus importante, il existe une différence dans l'abondance des neurones POMc dans le noyau ARC. En effet, les femelles ont plus de neurones POMc que les souris mâles, ce qui leur confère une résistance à l'obésité (Wang, He et al. 2018). Bien que Sim1 et Otp ait le même domaine d'expression et soit exprimé en même temps, il existe une petite différence : seul Otp est exprimé dans le noyau arqué. Les neurones POMc sont un point clé de l'équilibre énergétique, mais leur différenciation au niveau développemental n'est pas régulée par les facteurs de transcription Otp ni par Sim1. Donc, l'expression des neurones POMc et leur fonctionnalité ne devraient pas être affectée chez nos mutants. Cela pourrait expliquer pourquoi il n'y a pas de différence de masse entre les souris femelles $Otp^{+/-}Sim1^{tlz+/-}$ et les souris femelles $Sim1^{tlz+/-}$: elles ont un mécanisme de protection contre l'obésité avec les neurones POMc. D'un autre côté, comme les mâles n'ont pas autant de neurones POMc dans le noyau arqué, il est possible qu'ils ne soient pas protégés autant que les femelles à une obésité aussi prononcée que par la mutation simultanée de Sim1 et d'Otp. Une délétion spécifique du facteur de transcription TAp63 pour les neurones POMc a permis de mettre en relief que l'effet protecteur d'un plus grand nombre de neurones POMc contre l'obésité induite par une alimentation plus grasse est annulée (Wang, He et al. 2018). De la même façon, une surexpression du facteur de transcription TAp63 chez les souris mâles leur donnent une protection contre l'obésité induite par hyperphagie. Cependant, comme le nombre de souris femelles $Sim1^{+/tlz+}$ et $Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz+}$ n'est pas aussi élevé que chez les mâles, peut-être qu'un plus grand nombre de souris avec ces génotypes nous permettraient de bien discriminer cet effet.

CHAPITRE 4 : : Dissection du programme transcriptionnel induit par un gain de fonction de *Pou3f2*.

Introduction

Pou3f2 agit en aval de *Sim1* et *Otp* pour le développement de 3 lignées de neurones du PVN identifiables par l'expression de AVP, OT et CRH. Dans le cadre d'un projet parallèle, nous avons généré un modèle transgénique caractérisé par l'expression ectopique de *Pou3f2* dans le PVN prospectif. Ce transgène (tg(*Otp7-Pou3f2*)) est composé d'un fragment génomique de 7kb contenant les éléments régulateurs et le promoteur d'*Otp* cloné en amont du cDNA de *Pou3f2* (Fig. 21). Nous avons montré que les souris hémizygotes pour ce transgène présentent une expansion du domaine d'expression de *Pou3f2*, correspondant à celui d'*Otp*, ainsi qu'une augmentation du nombre de neurones exprimant la AVP, l'OT et la CRH. Nous avons aussi comparé le transcriptome de l'hypothalamus antérieur d'embryons hémizygotes de E12,5 avec celui d'embryons sauvages par RNAseq ce qui a nous permis d'identifier une série de gènes dont l'expression est significativement augmentée ou diminuée dans le premier cas par rapport au dernier. Afin de valider ces résultats, nous visons à comparer les patrons d'expression d'une série de gènes par hybridation *in situ*. Parmi les gènes dont l'expression est significativement augmentée (au moins deux fois) chez les embryons transgéniques, nous avons sélectionné deux gènes, *Lmo4* et *Fezf2*, qui participent au contrôle du développement de l'hypothalamus antérieur (Zaman, Zhou et al. 2014, Alvarez-Bolado and SpringerLink 2018) et deux autres gènes, *Sema3c* et *Lgi2*, dont on sait qu'ils sont des régulateurs du développement d'autres régions du cerveau (Kegel, Aunin et al. 2013, Mire, Hocine et al. 2018). Nous avons aussi sélectionné 3 gènes codant pour des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle du développement cérébral, *Sox14*, *Six6* et *NKX2.1* (Sussel, Marin et al. 1999, Kirilly, Gu et al. 2009, Larder, Clark et al. 2011) dont l'expression est significativement diminuée (au moins de 2 x) dans l'hypothalamus antérieur des embryons transgéniques par rapport aux embryons sauvages.

Matériel et méthodes

Animaux

Les souris ont été sevrées à partir de 3 semaines de vie et ont été maintenues par un background C57/B16 dans un cycle diurne de 12h.

Création de la lignée tg (Otp-Brn2)

L'ARN total d'un cerveau de souris E18.5 a été extrait pour amplifier l'ADNc de Brn2 dans toute sa longueur, puis trafiqué pour contenir une séquence de Kozak (CCGCCATGG). Cet ADNc modifié a été cloné en aval du promoteur OTP7 et en amont de la cassette IRES-GFP-PolyA.

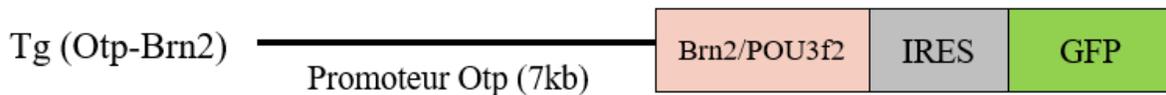


Figure 20. Souris transgénique exprimant Brn2/POU3f2 sous le promoteur d'Otp.

Schéma de la construction transgénique de la souris tg (Otp7-Brn2) comportant le promoteur Otp7 en amont de l'ADNc de Brn2 (rose). Une cassette contenant IRES-GFP-PolyA a été insérée en aval de l'ADNc de Brn2. (Non publié)

Embryons de souris

Une fois les embryons extraits de la mère, ceux-ci sont mis sur glace jusqu'à hypothermie. Ensuite, une partie de tissu de chaque embryon est conservée pour génotypage. Les têtes des embryons ont été fixées dans le paraformaldéhyde 4% pendant 12h, puis transmises dans une solution de sucrose 30% pour 12h. Par la suite, les têtes d'embryons ont été incluses dans l'OCT sur glace sèche. Des coupes de 20µm ont été effectuées au cryostat à -17°C et récoltées sur des lames chargées positivement. Les tranches ont été conservées à -20°C. Elles ont été placées à température pièce pendant une heure pour décongélation avant utilisation.

Clonage de sonde de souris

Des amorces ont été créées pour encadrer les ADNc d'environ 1kb des gènes d'intérêts identifiés lors du séquençage d'ARN. Ces ADNc ont ensuite été insérés dans un plasmide pTOPO selon les directives du kit (Cat. No. 450640 : Invitrogen). Les plasmides ont ensuite été clonés dans des bactéries DH5 et celles-ci ont été étalées sur des pétris dans un milieu avec LB + agarose + ampicilline, puis laissée 12h à 37°. Les colonies ont été piquées, multipliées dans un milieu LB avec l'antibiotique ampicilline. Le tout a été centrifugé et les plasmides purifiés selon les directives du kit (Cat. No. BS1649 ; Bio Basic). Une PCR a ensuite été effectuée sur le plasmide avec les

amorces SP6/T7 (pour le plasmide Topo) ou T7/T3 (pour le plasmide pBSK), mis sur gel, purifiée à l'aide d'un kit à extraction (Cat. No. BS354; Bio Basic), quantifiée au nanodrop et séquencée par Génome Québec. Une fois séquencé, il a été possible de déterminer si l'antisens de l'ADNc était en T7, SP6 ou T3 selon le plasmide d'appartenance. La transcription *in vitro* avec DIG-labeling mix a été effectuée et les sondes précipitées selon les directives du commerçant (Cat. No. 11277073910 ; Sigma). La sonde a ensuite été mise sur gel pour vérifier sa présence et sa taille. Un dotBlot a été effectué avec un anticorps anti-DIG afin de vérifier le fonctionnement de la sonde (Protocole).

Hybridation *in situ*

Les tranches de cerveaux d'embryons (E12.5) ont été conservées à -20°C, puis décongelées à température pièce pendant 1h. Les sondes ont été mises dans un tampon d'hybridation (Protocol + recette) et chauffées à 65°C pendant 10min avant d'être mises sur les tranches d'un embryon Wt et d'un embryon Tg (*Otp7-Pou3f2*) provenant de la même portée. Les tranches avec les sondes ont été couvertes par des lamelles et mises au four à 65°C pendant 12h dans une chambre humide (solution de lavage au fond). Les tranches sont ensuite trempées dans une solution de lavage (recette) déjà à 65°C pendant 15min pour faciliter le décollement des lamelles sans endommager les tranches. Les tranches ont ensuite subi deux lavages de 30min chacun à 65°C dans une solution de lavage. Ensuite, deux lavages au MABT 1X de 30min chacun à température pièce suivent. Les tranches sont couvertes d'une solution de blocage (2% BSA, 20% HISS, 1X MABT) pour 1h à 4°C avant d'ajouter l'anti-DIG (Cat. No. 11093274910; Roche) pour au moins 1h à 4°C. Par la suite, 4x lavages de MABT 1X de 30min chacun à température pièce sont effectués afin de mettre du BMPurple (Cat. No. 11442074001 ; Roche) pendant 4 à 12h ou jusqu'à ce que le domaine d'intérêt soit révélé. Finalement, 3x lavages au PBS 1X avec eau DEPC de 5min chacun sont nécessaires avant de monter les lames avec du vectashield (Cat. No. H-1000 ; Bio Lynx.inc), des lamelles et sceller avec du vernis à ongles transparents. Chaque hybridation *in situ* a été réalisée au moins deux fois.

Résultats et discussion

Dans un premier temps, nous avons comparé les patrons d'expression d'*Otp* et de *Pou3f2* le long de l'axe antéro-postérieur de l'hypothalamus antérieur (Fig.22) à E12,5. L'expression de *Pou3f2* est restreinte à un petit domaine du manteau de l'hypothalamus antérieur qui borde le 3^e ventricule

chez l'embryon sauvage. En revanche, chez les embryons transgéniques, ce domaine connaît une expansion pour occuper tout le domaine d'*Otp*. Il faut noter que *Otp* est aussi exprimé dans un domaine basal tant chez les embryons sauvages que chez les embryons transgéniques. Ce domaine donne naissance au noyau arqué. *Pou3f2* n'est pas exprimé dans ce domaine chez les embryons transgéniques, suggérant que le fragment génomique de 7kb de séquences régulatrices et promotrices du transgène n'est pas suffisant pour induire son expression dans cette région.

Les gènes surexprimés

Les gènes dont l'expression est augmentée

L'ARNm antisens *Lmo4* marque un domaine qui est similaire à celui de *Pou3f2* chez les embryons sauvages mais qui occupe tout le domaine d'*Otp* chez l'embryon mutant (Fig 21). *Fefz2* est exprimé dans la région ventriculaire de l'embryon sauvage, mais pas dans la région du manteau. Cependant, *Fefz2* se retrouve aussi exprimé dans un domaine similaire à celui d'*Otp* chez les embryons transgéniques (Fig. 21). L'expression de *Lgi2* et *Sema3c* est indétectable chez l'embryon sauvage, mais est retrouvée dans le domaine occupé par *Otp* chez les embryons transgéniques (Fig. 21). Ces résultats confirment que *Pou3f2* est suffisant pour induire l'expression de ces 4 gènes. Ces résultats soulèvent aussi la possibilité que *Lmo4* et *Fefz2* agissent en aval de *Pou3f2* pour le développement de l'hypothalamus antérieur. Cette possibilité pourrait être explorée à l'aide d'un modèle de perte de fonction de *Pou3f2* (voir chapitre 5). Finalement, ces résultats apportent une validation des résultats de notre étude de transcriptome.

Les gènes dont l'expression est diminuée

L'analyse du transcriptome avait montré une diminution d'expression de *Six6*, *Sox14* et *Nkx2.1* dans l'hypothalamus antérieur des embryons transgéniques par rapport aux embryons sauvages. Curieusement, tous ces gènes sont exprimés dans la région ventrale, mais ne le sont pas dans la région dorsale de l'hypothalamus antérieur qui donne naissance au PVN et SON (Fig 23). Nous n'avons pas observé une diminution de l'expression de ces gènes dans l'hypothalamus antérieur des embryons transgéniques (Fig 23). Il est possible que notre approche d'hybridation *in situ* ne soit pas assez sensible pour détecter une diminution de l'expression de ces gènes. Une approche de RT-PCR quantitatif pourrait être utilisée pour valider les résultats de notre étude transcriptomique. Cette technique ne donne toutefois pas d'information précise sur la distribution spatiale des transcrits.

Il est étonnant que ces 3 gènes soient tous exprimés dans un domaine où le transgène n'est pas exprimé. Dans la mesure où la diminution de leur expression était validée par une approche de PCR quantitatif, il faudrait possiblement évoquer l'existence un signal de l'hypothalamus dorsal dans les embryons transgéniques qui agirait à distance pour perturber le développement de l'hypothalamus basal.

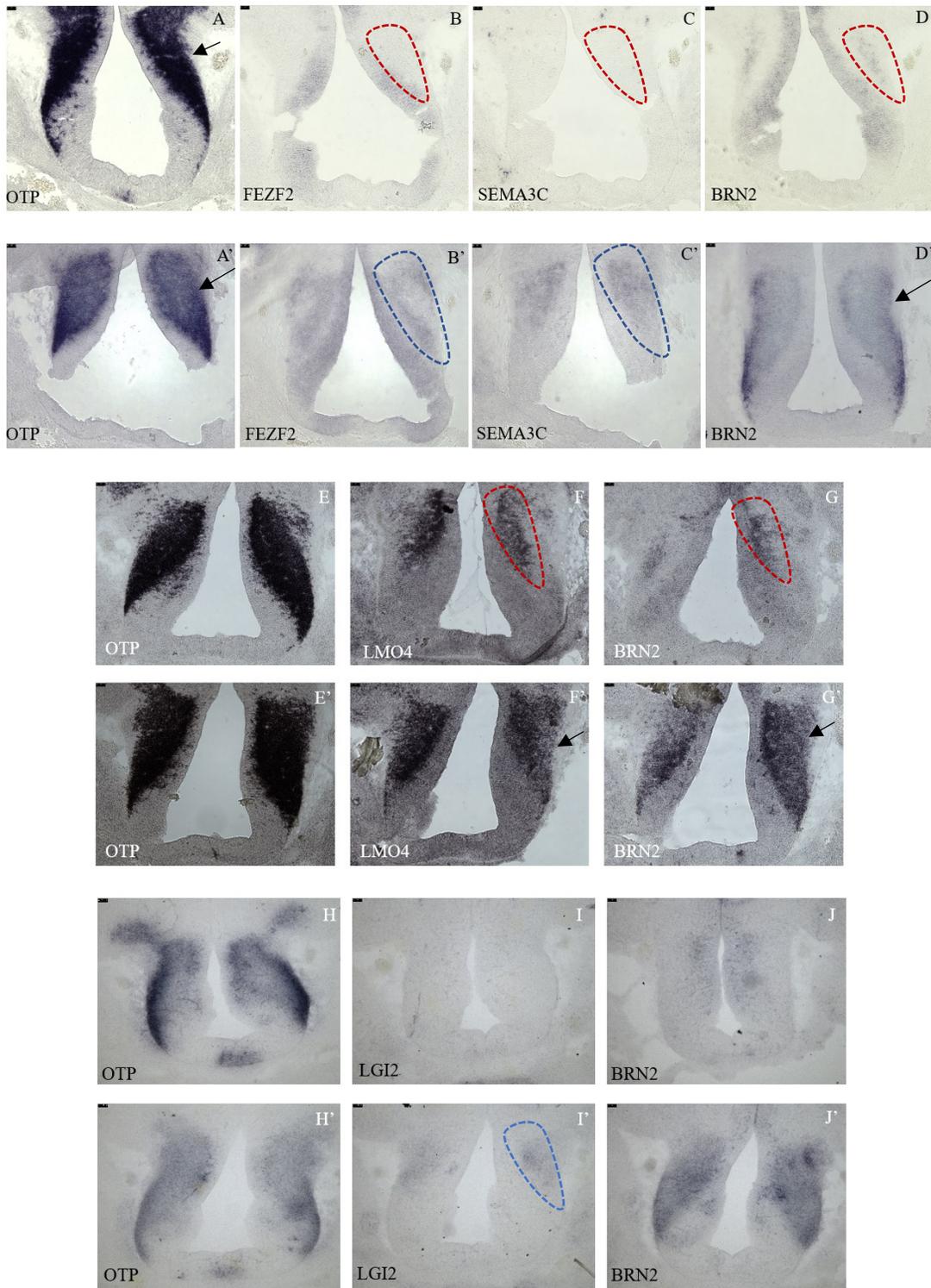


Figure 21. Hybridation in situ des hypothalamus antérieurs des marqueurs surexprimés chez l'embryons transgéniques Tg (Otp7-Pou3f2).

Les hypothalamus embryonnaires (12.5 jours de gestation) ayant le génotype Wt (A-J) et Tg (Otp7-Pou3f2). (A'-J') ont été marqués avec des sondes ARNm antisens Otp (A-A', E-E', H-H'), Pou3f2

(D-D', G-G', J-J'), Fezf2 (B-B'), Sema3c (C-C'), Lmo4 (F-F') et Lgi2 (I-I'). Les domaines d'expressions d'intérêts sont encerclés (rouge pointillé) chez les embryons sauvages et chez les embryons transgéniques (bleu pointillé).

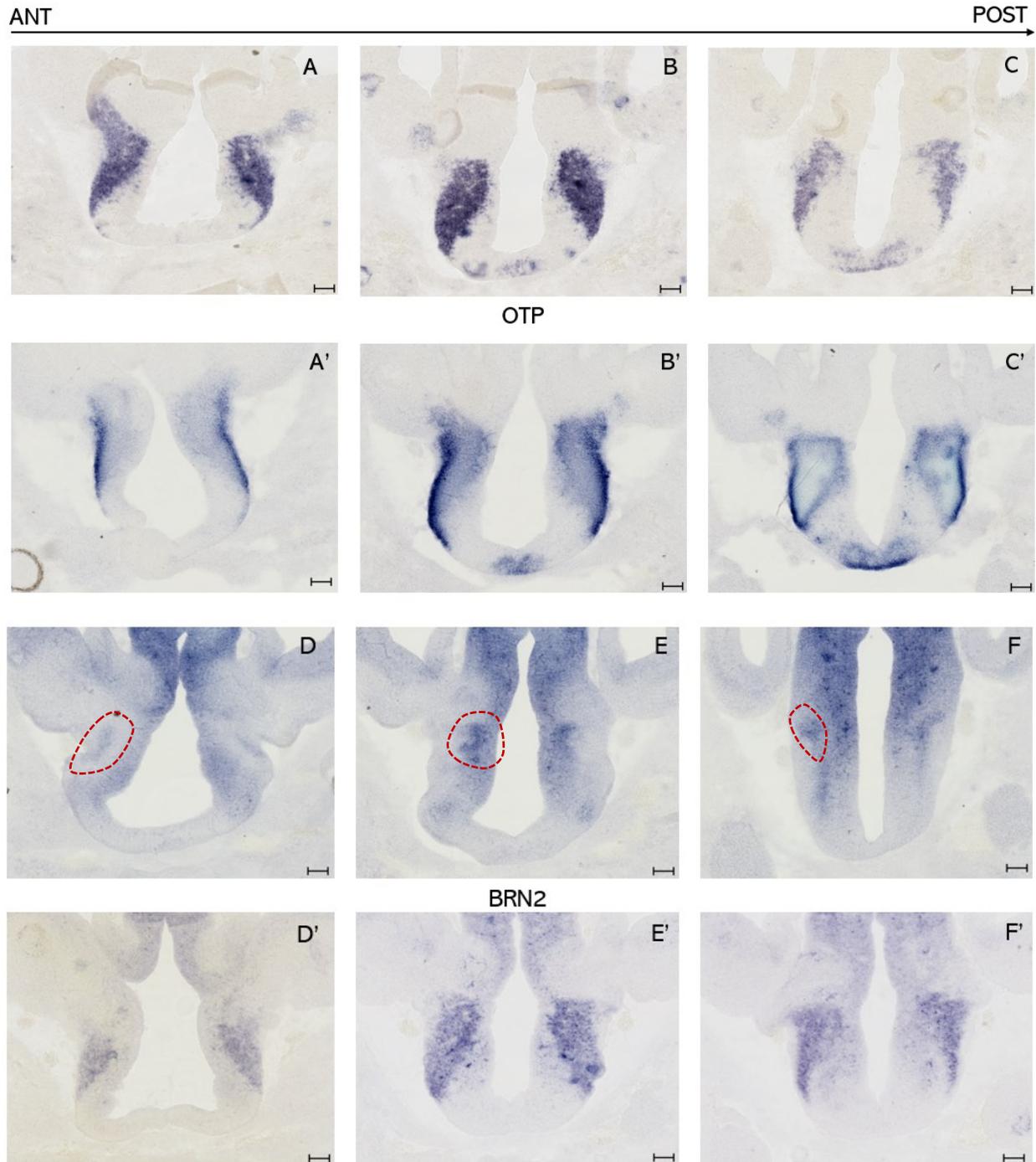
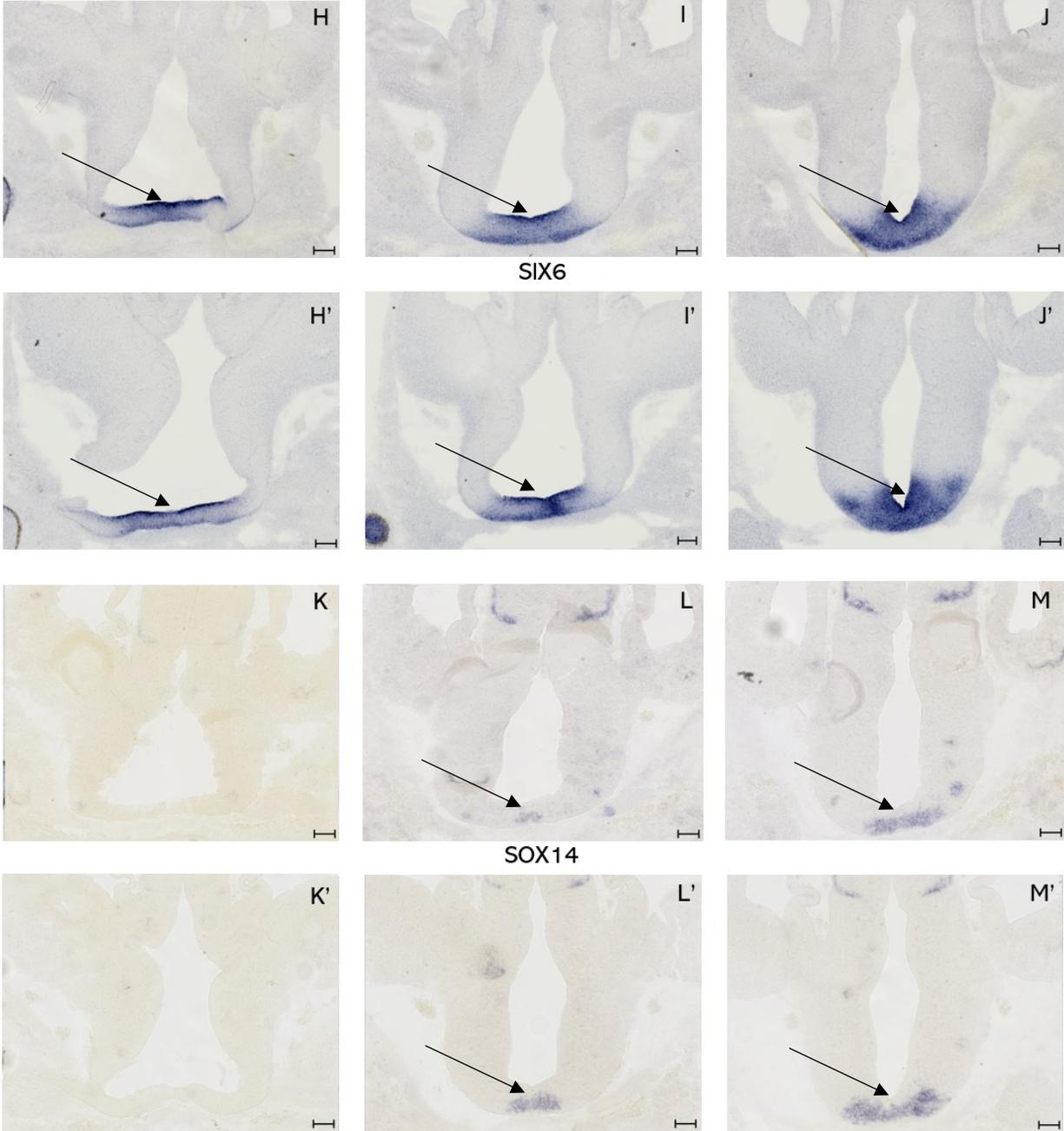


Figure 22. Hybridation in situ des hypothalamus embryonnaires de la partie antérieure à la partie postérieure pour OTP et POU3F2.

Les hypothalamus embryonnaires E12.5 sauvages (A-F) ont été marqué avec la sonde OTP (A-C) et la sonde Pou3f2 (D-E), tout comme l'hypothalamus de notre souris transgénique pour OTP (A'-C') et Pou3f2 (D'-F'). La population de cellules qui expriment Brn2 est mise en évidence (cercle rouge pointillé) chez l'embryon sauvage (D-F). Les hybridations in situ sont présentées de la coupe la plus antérieure (gauche) vers la coupe la plus postérieure (droite).

ANT

POST



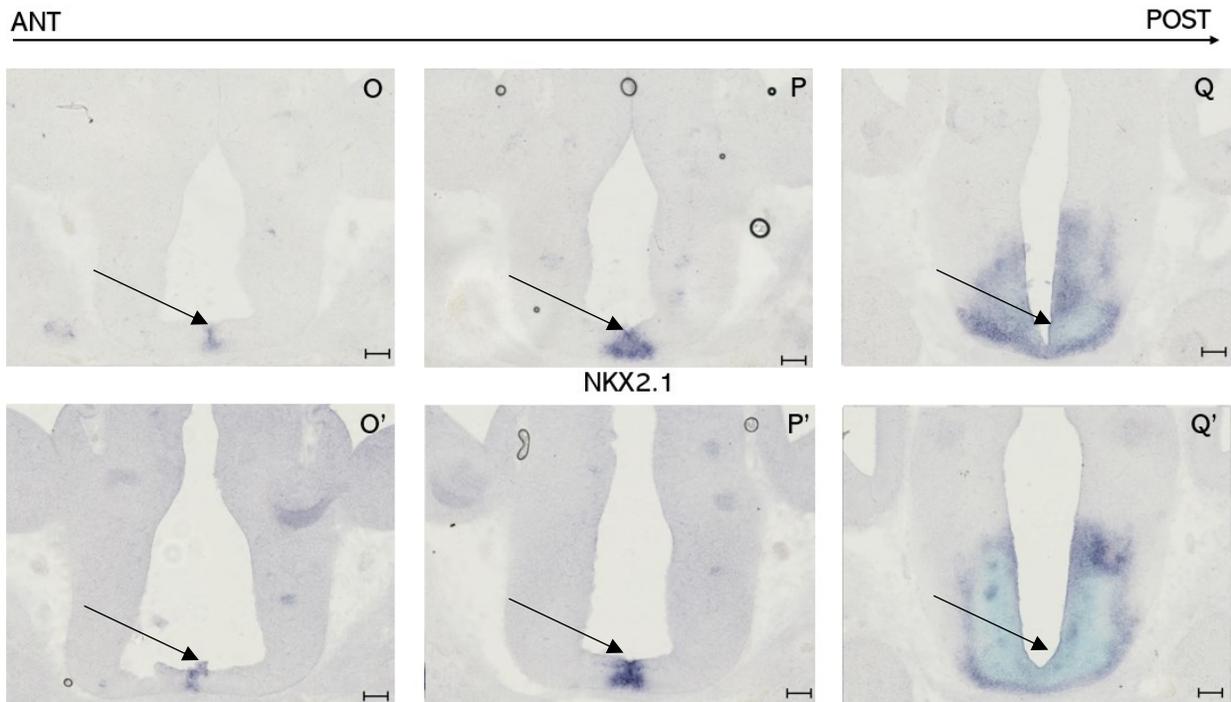


Figure 23. Hybridation in situ des hypothalamus antérieurs à postérieur d'embryon E12.5. Hybridation in situ des embryons de souris Wt (H-Q) et Tg (POU3F2-OTP7) (H'-Q') à 12 jours gestationnels. Les tranches vont de la partie la plus antérieure (gauche) vers la partie la plus postérieure (droite) de l'hypothalamus. Les marqueurs Six6 (H-J et H'-J'), Sox14 (K-M et K'-M') et NKX2.1(O-Q et O'-Q') ont été utilisés. Les domaines d'intérêts sont indiqués par les flèches noires.

CHAPITRE 5 : Génération et caractérisation d'un nouvel allèle nul de *Pou3f2*

Introduction

Pou3f2 est essentiel pour le développement des neurones à AVP, OT et CRH du PVN et est associé, comme SIM1 et OTP, à l'obésité. Toutefois, son rôle précis pour le développement du PVN et le contrôle de l'équilibre énergétique reste mal connu. Notre lignée Tg (*Pou3f2-Otp7*) représente un modèle de gain-de-fonction intéressant pour disséquer le programme développemental contrôlé par *Pou3f2*, mais qui ne permettra pas d'identifier les gènes qui sont nécessaires pour sa fonction. Afin de combler ce manque, nous avons comme objectif de générer un modèle de perte de fonction de *Pou3f2*.

Méthodes

Création d'un allèle nul de *Pou3f2* (*Pou3f2*^{-/-})

Le gène *Pou3f2* contient un seul exon. Nous avons visé à introduire une mutation tronquante en amont de la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN en mettant à profit la technologie CrispR-cas9. L'abolition de ce domaine rendra la protéine non-fonctionnelle. Nous avons ainsi conçu un guide ARN (5'-TAGACAAGATCGCAGCGCAA-3') qui coupe le double brin d'ADN en amont de la séquence codant pour le domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un gabarit constitué de bras d'homologie flanquant la séquence TAA (stop)-CG-AATTC (EcoR1) (Fig.29). Notre stratégie vise donc à créer une cassure double-brin qui induira un événement de recombinaison homologue impliquant notre gabarit ce qui conduira à l'introduction du codon stop prématuré TAA ainsi que d'un site EcoR1(AATTC) pour permettre un génotypage plus rapide (Voir annexe 2). Ces guides, le gabarit et un vecteur exprimant cas9 ont été injectés dans des zygotes au McGill Integrated Core for Animal Modeling (MICAM). L'outil de traduction ExPasy avec l'évaluation de SWISS-MODEL a mis en relief la production d'une protéine tronquée à la suite de l'insertion d'un codon stop dans le gène *Pou3f2*. Cependant, la structure tridimensionnelle de la protéine d'origine n'est pas conservée et la mutation créée empêche la traduction du domaine de liaison à l'ADN. Un test de protéine tronquée (PTT) serait nécessaire afin de voir la présence de cette protéine tronquée (Roest, Roberts et al. 1993). D'autres tests de seront nécessaire afin de

déterminer si cette protéine tronquée cause des effets indépendants de la mutation du gène Pou3f2 à elle seule.

Hybridation in situ et immunohistochimie

Les expériences d'hybridation in situ et d'immunohistochimie ont été réalisées en suivant les protocoles décrits dans la section matériel et méthodes du chapitre 2 (p.42-43). Toutes les analyses ont été réalisées au moins 3 fois.

Allèle wt du gène Pou3f2 comportant un seul exon (rectangle vide) et un domaine de liaison à l'ADN (DLA) en jaune. Le ciseau montre l'endroit où la coupe du double brin a eu lieu. La coupe du double brin par la cas9 mène à une opportunité pour la séquence TAA-CG-AATTC de s'insérer avant le DLA. La séquence TAA est un codon STOP (rouge) et la séquence AATTC est la séquence de EcoR1(vert).

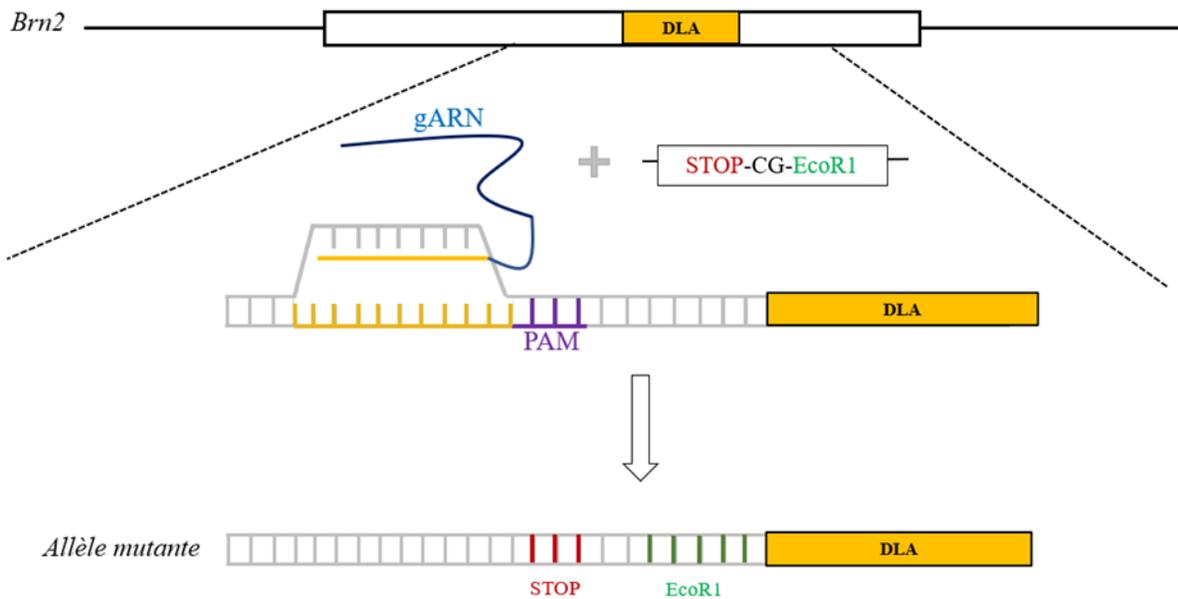


Figure 24. Stratégie CRisPR-cas9 pour la création de la lignée POU3F2KO.

Allèle Wt du gène Pou3f2 comportant un seul exon (rectangle vide) et un domaine de liaison à l'ADN (DLA) en jaune. Le ciseau montre l'endroit où la coupe du double brin a eu lieu. La coupe du double brin par la cas9 mène à une opportunité pour la séquence TAA-CG-AATTC de s'insérer avant le DLA. La séquence TAA est un codon STOP (rouge) et la séquence AATTC est la séquence de EcoR1(vert).

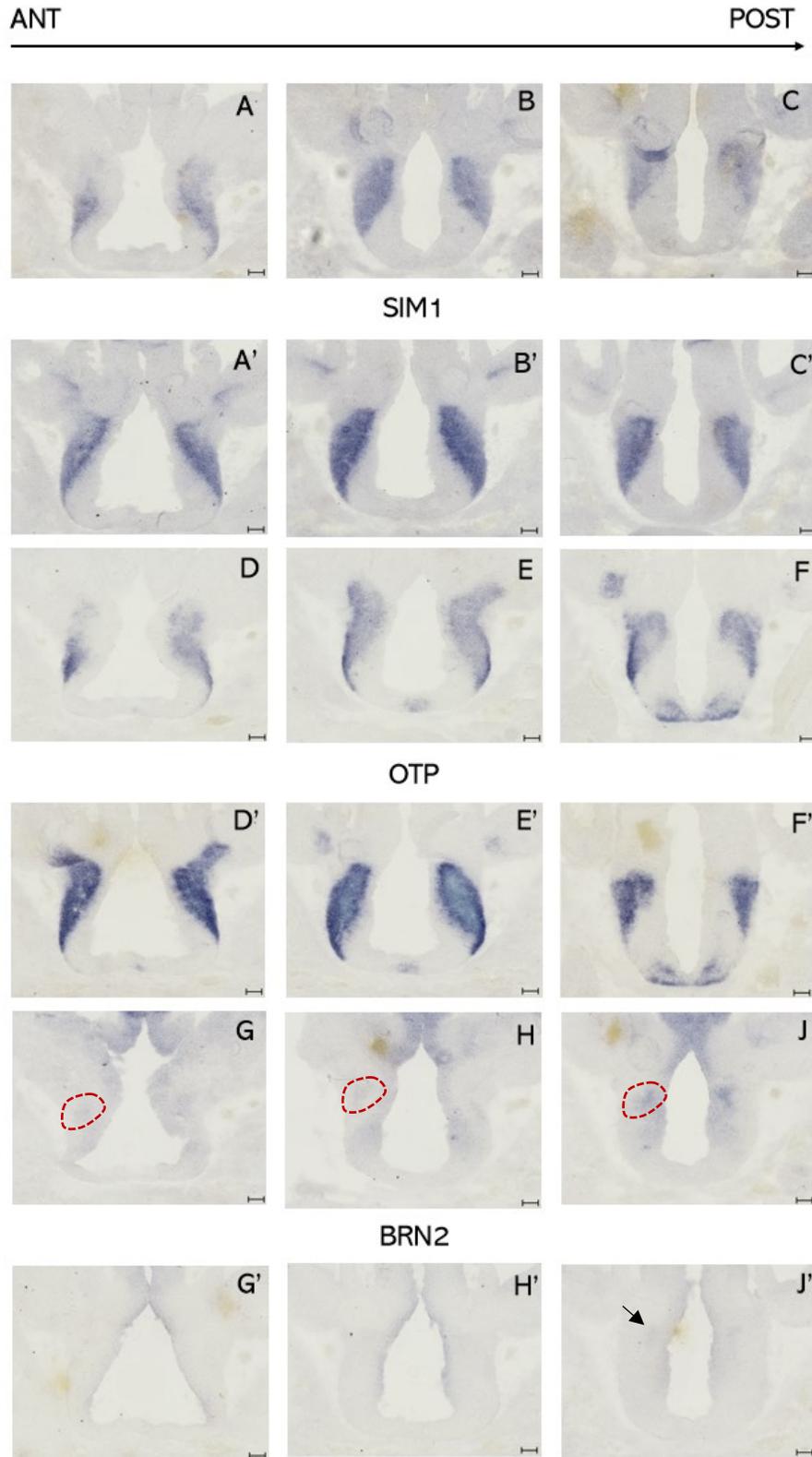


Figure 25. Caractérisation du mutant POU3F2KO à E12.5.

Hybridation in situ des sondes OTP, SIM1 et POU3F2 sur des hypothalamus prospectifs à l'âge embryonnaire 12.5 jour gestationnel. Les marqueurs Sim1 (A-C et A'-C'), Otp (D-F et D'-F') et POU3F2 (G-J et G'-J') ont été utilisés. La région pointillée (G-J) représente la population de cellule exprimant le facteur de transcription POU3F2 chez l'embryon Wt. La flèche (J') indique un faible marquage dans le domaine d'expression de POU3F2.

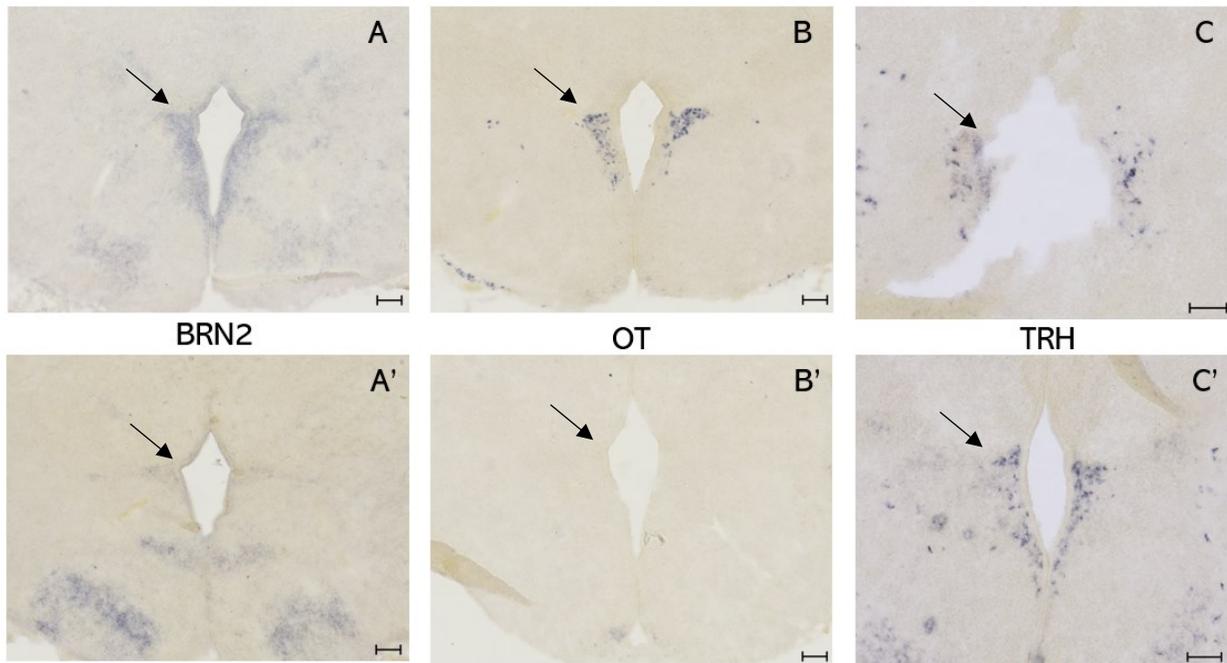


Figure 26. Caractérisation par hybridation in situ et immunofluorescence de marqueurs de l'hypothalamus antérieur pour des embryons E18.5 Wt et $Brn2^{+/-}$.

Les photos du haut (A-C) correspondent à l'embryon de génotype sauvage, tandis que les photos du bas (A'-C') représentent l'embryon de génotype $Brn2^{-/-}$. Les marqueurs BRN2 (A-A'), OT (B-B') et TRH (C-C') ont été utilisés. Les domaines d'intérêt sont indiqués (flèches noires).

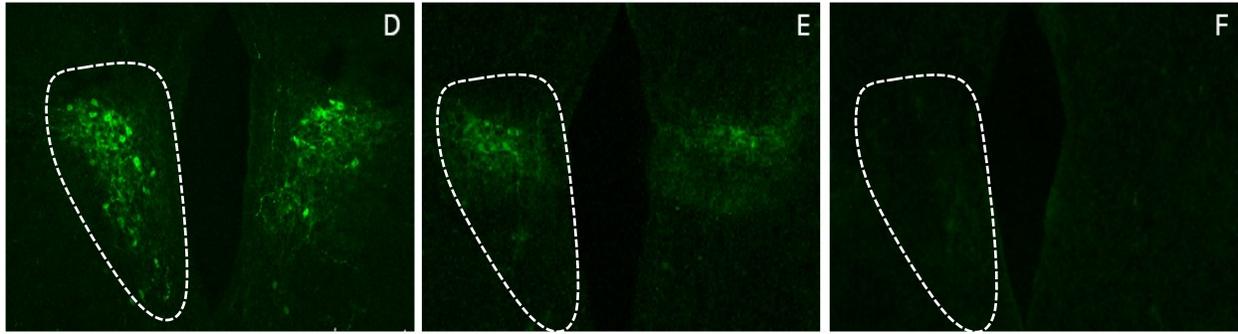


Figure 27. Caractérisation de la lignée POU3F2 avec le marqueur d'AVP au niveau du cerveau embryonnaire E18.5.

Les embryons de génotype sauvage (D), POU3F2^{+/-} (E) et POU3F2^{-/-} (F) ont été comparés pour l'expression de l'AVP par immunofluorescence. La région d'intérêt (PVN) est indiquée (pointillés blanc).

Résultats et discussion

Nous avons obtenu une souris fondatrice porteuse de la séquence mutante recherchée. Le croisement de cette souris à une souris sauvage B57bl/6 a conduit à la transmission germinale de la mutation. Nous avons maintenu la mutation sur un fond B57bl/6 pour plus de 3 générations. Le génotypage à 3 semaines de vie de souris (plus de 100 souris) issues d'un croisement entre souris Pou3f2^{+/-} a montré l'absence de souris homozygotes. Cette observation était attendue puisqu'il a été montré que l'homozygotie pour deux autres allèles nuls de Pou3f2 conduit à une létalité périnatale (Nakai, Kawano et al. 1995, Schonemann, Ryan et al. 1995).

Nous avons cherché à caractériser l'impact fonctionnel de cette mutation en étudiant l'expression de marqueurs dans l'hypothalamus en développement. À E12.5, nous n'avons pas observé de changement de l'expression de Sim1 et Otp dans l'hypothalamus antérieur des embryons Pou3f2^{-/-} ce qui était attendu puisque ces facteurs agissent en amont de Pou3f2 (Fig.25). En revanche, l'expression de Pou3f2 est diminuée, mais semble présente chez les embryons mutants au moins dans la portion postérieure de son domaine (Fig.25, J').

À E18.5, nous avons observé une perte de l'expression de Pou3F2, OT et AVP, mais non de Trh dans la région du PVN des embryons mutants (Fig. 26 et 27). Ce patron est très précisément ce qui était attendu chez ces mutants sur la base d'études réalisées chez deux autres mutants de Pou3f2

(Nakai, Kawano et al. 1995, Schonemann, Ryan et al. 1995). Nous concluons que notre allèle a le même impact fonctionnel que ces autres mutations.

Chapitre 6: Discussion

Otp et Sim1

La lignée mutante pour Sim1 a été préalablement caractérisée par notre laboratoire, puis nous avons fait de même pour la nouvelle lignée que nous avons créée avec CrispR-cas9. Le but de ces expériences était de déterminer si les lignées cellulaires responsables impliquées dans la formation du PVN étaient affectées de la même façon pour une mutation du gène Otp que pour Sim1. Il était également soupçonné qu'Otp et Sim1 forment un complexe protéique en agissant ensemble pour l'expression de Brn2. Les résultats présentés dans le chapitre 2 de ce mémoire ne permettent pas de confirmer or de tout doute que les deux facteurs de transcription forment effectivement ou non un complexe protéique. Comme il n'existe pas de bon anticorps contre Sim1, une stratégie pour détourner ce problème est de traduire in vitro la protéine Sim1 avec un Tag tel que HA (Michaud, DeRossi et al. 2000). En effet, la partie HA peut-être reconnue par un anticorps. Cette technique a été performée avec des protéines traduites in vitro pour ARNT2, cette interaction n'est donc pas appliquée dans un contexte physiologique complet, mais des expériences antérieures avaient permis de détecter une interaction dans des bactéries (Ema, Morita et al. 1996). Néanmoins, l'utilisation de la technique de CrispR-cas9 permet l'insertion de ce même tag et de purifier le complexe protéique potentiel formé avec Otp dans un contexte in vivo. Il est également possible que Sim1 et Otp interagissent ensemble, mais pas de façon directe. Par exemple, ils se peut qu'ils se lient sur des endroits différents d'un plus grand complexe protéique et qu'aucune interaction directe n'ait lieu. Dans ce cas, une spectrométrie de masse permettrait d'identifier la présence ou non de Otp et de Sim1. Cependant, le point faible de cette méthode est qu'il n'est pas possible d'apprécier l'aspect quantitatif de ces complexes protéiques (Gorka, Swart et al. 2019). Le profil quantitatif d'un complexe peut effectivement aider à comprendre comment cela peut influencer la fonction de ce complexe. Pour contourner ce problème, il a été démontré que la combinaison de la spectrométrie de masse avec la technique de *Complexom Clear-Native-PAGE* permet de mettre en relief l'identité des protéines et la quantité de celles-ci dans un complexe protéique (Gorka, Swart et al. 2019).

Un autre aspect qui pourrait renforcer l'idée de formation d'un complexe protéique serait de comparer le transcriptome de l'hypothalamus en développement des mutants de Sim1 et d'OTP. En effet, il serait intéressant de déterminer l'identité et la quantité des gènes affectés de la même façon par la perte de fonction de ces facteurs de transcriptions. Une quantité importante de gènes communs affectés par la perte de fonction de Sim1 et de Otp n'est pas garant d'une interaction entre ces deux facteurs de transcription. Sim1 et Otp pourrait simplement être situé relativement plus en amont dans cette cascade transcriptionnelle et affecter plus d'éléments en aval. Si, par exemple, le profil de gènes affectés en aval de Sim1 et d'Otp ne sont pas nombreux, mais sont particulièrement importants pour le développement de l'hypothalamus, cela peut consolider l'idée d'un complexe protéique. Étant donné qu'Otp est en partie responsable du développement de lignées cellulaires dans l'ARC et que ce n'est pas le cas de Sim1, une partie du profil transcriptionnel sera nécessairement différent, mais ne va pas contribuer à comprendre l'interaction possible dans leur territoire commun, c'est-à-dire dans le PVN. Il est difficile de disséquer en particulier un noyau précis et d'en extraire l'ARN pour un cerveau d'embryon. Cependant, le *Laser Capture Microdissection* permet une dissection très fine de partie du cerveau tout en préservant l'intégrité de l'ARN. Il est possible d'utiliser un marquage GFP pour faciliter la dissection de ces petits noyaux.

D'un point de vue d'équilibre énergétique, les souris Otp^{+/-}Sim1^{+/tlz} mâles ne consomment pas plus de nourriture que les Sim1^{+/tlz}, ce qui suggère un ralentissement du métabolisme pour une mutation d'Otp. Bien que d'autres études aient suggérés que la mutation d'Otp entraîne une obésité par hyperphagie, il serait intéressant de compléter nos résultats avec des expériences métaboliques. Par exemple, l'utilisation de cage métabolique ainsi que des mesures plasmatiques de glucose, d'insuline et de leptine et d'évaluer leurs dépenses énergétiques (Michaud 2001). De cette façon nous pourrions déterminer si la mutation d'Otp mène à une obésité purement hyperphagique ou si d'autres facteurs entrent en ligne de compte. Il semble y avoir également un dimorphisme sexuel par rapport au développement de l'hypothalamus quand on compare la façon dont les mâles et les femelles ont pris de la masse chez nos mutants. Il serait intéressant de faire ces tests en tenant compte de ce dimorphisme pour voir si le métabolisme est différent pour le même génotype, mais un sexe différent.

Il a aussi été répertorié qu'Otp joue un rôle dans la réponse au stress chez les poissons zèbres et chez les rongeurs. La réponse au stress peut également avoir un impact sur le métabolisme et la prise de poids, il serait donc intéressant d'avoir un test comportemental de type *open field* pour voir comment les souris sauvages et hétérozygotes pour Otp se comportent. Plusieurs articles en lien avec l'agressivité et l'hypothalamus ont été publiés et nous avons remarqué que notre lignée semble plus réactive aux manipulations avec les mains (Haller 2013, Miczek and Meyer-Lindenberg 2014, Falkner, Grosenick et al. 2016). Par exemple, les neurones dans la partie ventrolatérale du VMH deviennent actifs dans un contexte d'agressivité chez la souris mâle. Ceci a été mis en relief par de l'enregistrement électrophysiologique de cellules seules et par l'enregistrement optique dans un contexte comportemental (Falkner, Grosenick et al. 2016). Même si Otp n'est pas exprimé dans le VMH, il existe un réseau intrinsèque de connexion entre les noyaux de l'hypothalamus. En effet, l'ARC et le PVN possèdent des connexions réciproques dans le contrôle de l'apport alimentaire. Le VMH étant connu pour également avoir un rôle dans l'apport alimentaire, celui-ci n'est pas à négliger quant à la perte de fonction de Otp et/ou de Sim1, menant à une dysfonction du PVN. Ce dernier constitue la sortie majeure d'information vers le nerf vague (McClellan, Parker et al. 2006).

Il serait intéressant à l'aide d'un RT-qPCR en visant les mêmes gènes qui sont affectés par une perte de fonction de Sim1 que pour Otp.

POU3f2

Ce facteur de transcription agit en aval de Sim et d'Otp, Nous avons pu créer une lignée ayant un codon stop et un site EcoR1 à l'aide de la technologie CrispR-cas9. Dans une optique optimiste, il avait été prévu d'obtenir cette lignée en même temps que celle d'OTP. Cependant, des complications dans la génération de la lignée en lien avec la présence d'un seul exon ont compliqué le génotypage. Pour ces raisons, nous avons eu le temps de caractériser cette lignée, mais des expériences futures permettront de répondre complètement à nos hypothèses. Il était effectivement question de savoir si Brn2 est nécessaire et suffisant pour le développement de l'hypothalamus antérieur. Si Brn2 est nécessaire pour le développement de l'hypothalamus antérieure (PVN), alors ce noyau ne peut exister sans la présence de Brn2. Si Brn2 est suffisant pour le développement de l'hypothalamus, alors Brn2 doit être présent pour le développement du PVN. Il existe une nuance dans l'optique où Brn2 pour être nécessaire pour le développement de l'hypothalamus antérieur, mais l'implication d'autres facteurs de transcriptions doivent être impliqués. Autrement dit, Brn2

n'est peut-être pas suffisant en lui-même pour générer les lignées constituant le PVN. Pour répondre à cette question, il faut d'abord déterminer si l'absence de *Brn2* affecte les lignées cellulaires importantes qui permet à l'hypothalamus antérieur de bien fonctionner. D'après les résultats obtenus au chapitre 3, on voit l'absence des lignées cellulaires de AVP et Oxt, deux lignées particulièrement importantes dans la constitution du PVN. Cependant, est-ce que *Brn2* est suffisant à lui seul pour générer ces lignées ? La nécessité de *Brn2* pour le développement du PVN ne garantissant pas sa suffisance, l'implications d'autres facteurs de transcriptions peuvent interagir avec *Brn2* ou agir en parallèle dans la génération des lignées cellulaires constituant le PVN. Tout comme *Sim1* et *Otp* sont tous les deux nécessaires pour le développement de l'hypothalamus, la mutation de l'un des deux empêche le développement de lignées cellulaires cruciales du PVN. *Otp* n'est pas donc pas suffisant en lui-même pour générer toutes les lignées cellulaires du PVN. Une des façon de tester la suffisance d'un facteur de transcription dans la génération de lignées cellulaires est de surexprimer ce gène dans une sous-population cellulaire connue pour ne pas exprimer ce gène et de voir si le destin de ces cellules changent (Zheng and Flavell 1997). La souris transgénique générée dans notre laboratoire surexprime le gène *Brn2* sous toute la population d'OTP. Dans des conditions sauvages, *Brn2* n'est exprimé que dans une sous-population de l'hypothalamus prospectif à E12.5 chez l'embryon de souris, contrairement à *Otp* qui occupe une partie latérale et basale au 3^e ventricule. Si *Brn2* est effectivement suffisant, on peut s'attendre chez notre transgène *Otp7-Brn2* à ce que les lignées cellulaires ne nécessitant pas *Brn2* pour leur développement soient diminuées et que le destin de ces précurseurs cellulaires devient des lignées cellulaires qui dépendent de *Brn2*, c'est-à-dire à OT, AVP et CRH. Autrement dit, une diminution des populations de TRH et SS diminueraient pour permettre à plus de précurseurs de devenir des cellules à OT, AVP et CRH.

Conclusion

En conclusion, nous avons généré un modèle de souris en mutant le gène *Otp* et avons confirmé sa caractérisation par une réduction de l'expression d'AVP, OT, OTP et TRH. La double mutation (*Otp*^{+/-}*Sim1*^{+/tlz+}) entraîne un gain pondéral plus important seulement chez les souris mâles, mais l'exploration d'un dimorphisme sexuel pour le développement de l'hypothalamus pourrait expliquer la différence entre les mâles et les femelles. Davantage de souris seront nécessaires pour comprendre la façon dont l'équilibre énergétique est affecté par la mutation du gène *Otp*.

Finalemant, nous avons généré une souris mutante pour le gène *Pou3f2* et avons caractérisé les effets de cette perte de fonction sur ses marqueurs en aval. Nous avons noté une diminution de l'expression de POU3F2, OT, AVP, mais aucun changement pour la TRH.

Références

- Abuzzahab, M. J., C. L. Roth and A. H. Shoemaker (2019). "Hypothalamic Obesity: Prologue and Promise."
- Acampora, D., M. Gulisano and A. Simeone (1999). "Otx Genes and the Genetic Control of Brain Morphogenesis." MOLECULAR AND CELLULAR NEUROSCIENCE **13**(1): 1-8.
- Acampora, D., M. P. Postiglione, V. Avantaggiato, M. Di Bonito, F. M. Vaccarino, J. Michaud and A. Simeone (1999). "Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene." Genes & Development **13**(21): 2787-2800.
- Alvarez-Bolado, G. and SpringerLink (2018). "Development of neuroendocrine neurons in the mammalian hypothalamus."
- Andersen, B. and M. G. Rosenfeld (2001). "POU Domain Factors in the Neuroendocrine System: Lessons from Developmental Biology Provide Insights into Human Disease*." Endocrine Reviews **22**(1): 2-35.
- Arnold-Aldea, S. A. and C. L. Cepko (1996). "Dispersion Patterns of Clonally Related Cells during Development of the Hypothalamus." YDBIO Developmental Biology **173**(1): 148-161.
- Bankir, L., D. G. Bichet and N. G. Morgenthaler (2017). "Vasopressin: physiology, assessment and osmosensation." JOIM Journal of Internal Medicine **282**(4): 284-297.
- Bedont, J. L., E. A. Newman and S. Blackshaw (2015). "Patterning, specification, and differentiation in the developing hypothalamus." Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology **4**(5).
- Ben-Jonathan, N., L. A. Arbogast and J. F. Hyde (1989). "Neuroendocrine [corrected] regulation of prolactin release." Progress in neurobiology **33**(5-6): 5-6.
- Blevins, J. E. and D. G. Baskin (2015). "Translational and therapeutic potential of oxytocin as an anti-obesity strategy: Insights from rodents, nonhuman primates and humans." PHB Physiology & Behavior: Part B **152**: 438-449.
- Bonnefond, A., A. Raimondo, F. Stutzmann, M. Ghossaini, S. Ramachandrapa, D. C. Bersten, E. Durand, V. Vatin, B. Balkau, O. Lantieri, V. Raverdy, F. Pattou, W. Van Hul, L. Van Gaal, D. J. Peet, J. Weill, J. L. Miller, F. Horber, A. P. Goldstone, D. J. Driscoll, J. B. Bruning, D. Meyre, M. L. Whitelaw and P. Froguel (2013). "Loss-of-function mutations in SIM1 contribute to obesity and Prader-Willi-like features." The Journal of Clinical Investigation **123**(7): 3037-3041.
- Bouret, S. (2017). "Development of Hypothalamic Circuits That Control Food Intake and Energy Balance." 135-154.
- Burbridge, S., I. Stewart and M. Placzek.
- Burbridge, S., I. Stewart and M. Placzek (2016). "Development of the Neuroendocrine Hypothalamus." Comprehensive Physiology **6**(2): 623-643.
- Caqueret, A., F. Boucher and J. L. Michaud (2006). "Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus." YDBIO Developmental Biology **298**(1): 95-106.
- Caqueret, A., C. Yang, S. Duplan, F. Boucher and J. L. Michaud (2005). "Looking for Trouble: A Search for Developmental Defects of the Hypothalamus." Hormone Research **64**(5): 222-230.
- Chen, R., X. Wu, L. Jiang and Y. Zhang (2017). "Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity." Cell Reports Cell Reports **18**(13): 3227-3241.
- Collins, B., S. Pierre-Ferrer, C. Muheim, D. Lukacsovich, Y. Cai, A. Spinnler, C. G. Herrera, S. Wen, J. Winterer, M. D. C. Belle, H. D. Piggins, M. Hastings, A. Loudon, J. Yan, C. Földy, A. Adamantidis and S. A. Brown (2020). "Circadian VIPergic Neurons of the Suprachiasmatic Nuclei Sculpt the Sleep-Wake Cycle." Neuron **108**(3): 486-499.
- Del Giacco, L., P. Sordino, A. Pistocchi, N. Andreakis, R. Tarallo, B. Di Benedetto and F. Cotelli (2006). "Differential regulation of the zebrafish orthopedia 1 gene during fate determination of diencephalic neurons." BMC developmental biology **6**.
- Dillingham, C. M., M. M. Milczarek, J. C. Perry and S. D. Vann (2021). "Time to put the mammillothalamic pathway into context." Neurosci. Biobehav. Rev. Neuroscience and Biobehavioral Reviews **121**: 60-74.

Duplan, S. M., F. Boucher, J. L. Michaud and L. Alexandrov (2009). "Impact of Sim1 gene dosage on the development of the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus." Eur. J. Neurosci. European Journal of Neuroscience **30**(12): 2239-2249.

Eaton, J. L. and E. Glasgow (2007). "Zebrafish orthopedia (otp) is required for isotocin cell development." Dev Genes Evol Development Genes and Evolution **217**(2): 149-158.

Eliava, M., H. S. Knobloch-Bollmann, M. da Silva Gouveia, Y. Tang, L. C. Roth, F. Althammer, T. Gruber, V. Grinevich, M. Melchior, J. Wahis, V. Chavant, Y. Goumon, N. Petit-Demouliere, P. Poisbeau, A. Charlet, H. S. Knobloch-Bollmann, L. C. Roth, T. Gruber, G. Giese, R. Sprengel, P. H. Seeburg, V. Grinevich, A. C. Ciobanu, R. Triana del Rio, R. Stoop, Y. Tang, M. Busnelli, B. Chini, B. Chini, L. L. Tan, R. Kuner, M. Mitre, R. C. Froemke, M. V. Chao, A. Charlet, V. Grinevich and H. S. Knobloch-Bollmann (2016). "A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing." Neuron **89**(6): 1291-1304.

Ema, M., M. Morita, S. Ikawa, M. Tanaka, Y. Matsuda, O. Gotoh, Y. Saijoh, H. Fujii, H. Hamada, Y. Kikuchi and Y. Fujii-Kuriyama (1996). "Two new members of the murine Sim gene family are transcriptional repressors and show different expression patterns during mouse embryogenesis." Molecular and Cellular Biology **16**(10): 5865-5875.

Ericson, J., J. Muhr, M. Placzek, T. Lints, T. M. Jessel and T. Edlund (1995). "Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: A common signal for ventral patterning within the neural tube." CELL **81**(5): 747-756.

Faivre, L., V. Cormier-Daire, J. Lapierre, L. Colleaux, S. Jacquemont, D. Genevieve, P. Saunier, A. Munnich, C. Turleau, S. Romana, M. Prieur, M. C. De Blois and M. Vekemans (2002). "Deletion of the SIM1 gene (6q16.2) in a patient with a Prader-Willi-like phenotype." Journal of Medical Genetics **39**(8): 594-596.

Falkner, A. L., L. Grosenick, T. J. Davidson, K. Deisseroth and D. Lin (2016). "Hypothalamic control of male aggression-seeking behavior." Nat Neurosci Nature Neuroscience **19**(4): 596-604.

Flak, J. N., P. B. Goforth, J. Dell'Orco, P. V. Sabatini, C. Li, N. Bozadjieva, M. Sorensen, A. Valenta, A. Rupp, A. H. Affinati, C. Cras-Méneur, A. Ansari, J. Sacksner, N. Kodur, D. A. Sandoval, R. T. Kennedy, D. P. Olson and M. G. Myers "Ventromedial hypothalamic nucleus neuronal subset regulates blood glucose independently of insulin." The Journal of Clinical Investigation **130**(6): 2943-2952.

Flament-Durand, J. (1980). "The hypothalamus: anatomy and functions." Acta psychiatrica Belgica **80**(4).

Gao, Y., T. Sun and SpringerLink (2015). "Molecular regulation of hypothalamic development and physiological functions."

Gorka, M., C. Swart, B. Siemiatkowska, S. Martínez-Jaime, A. Skirycz, S. Streb and A. Graf (2019). "Protein Complex Identification and quantitative complexome by CN-PAGE." Scientific reports **9**(1).

Guyenet, P. G. (2006). "The sympathetic control of blood pressure." Nature reviews. Neuroscience **7**(5): 335-346.

Guzmán, A., C. G. Hernández-Coronado, A. M. Rosales-Torres and J. H. Hernández-Medrano (2019). "Leptin regulates neuropeptides associated with food intake and GnRH secretion." Annales d'endocrinologie **80**(1): 38-46.

Hagino-Yamagishi, K., Y. Saijoh, M. Ikeda, M. Ichikawa, R. Minamikawa-Tachino and H. Hamada (1997). "Predominant expression of Brn-2 in the postmitotic neurons of the developing mouse neocortex." Brain Research Brain Research **752**(1-2): 261-268.

Haller, J. (2013). "The neurobiology of abnormal manifestations of aggression: A review of hypothalamic mechanisms in cats, rodents, and humans." BRB Brain Research Bulletin **93**: 97-109.

Harter, C. J. L., G. S. Kavanagh and J. T. Smith (2018). "The role of kisspeptin neurons in reproduction and metabolism." Journal of Endocrinology **238**(3): R173-R183.

Herbison, A. E. (2016). "Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons." Nat. Rev. Endocrinol. Nature Reviews Endocrinology **12**(8): 452-466.

Holder, J. L., N. F. Butte and A. R. Zinn (2000). "Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene." HUMAN MOLECULAR GENETICS **9**: 101-108.

Hosoya, T., Y. Oda, S. Takahashi, M. Morita, S. Kawauchi, M. Ema, M. Yamamoto and Y. Fujii-Kuriyama (2001). "Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice." Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms **6**(4): 361-374.

Ishii, Y. and S. G. Bouret (2012). "Embryonic Birthdate of Hypothalamic Leptin-Activated Neurons in Mice." Endocrinology **153**(8): 3657-3667.

Iwasaki, H., E. Jodo, A. Kawauchi, T. Miki, Y. Kayama and Y. Koyama (2010). "Role of the lateral preoptic area and the bed nucleus of stria terminalis in the regulation of penile erection." BRAIN RESEARCH **1357**: 70-78.

Jacobowitz, D. M. (1998). Chemoarchitectonic atlas of the developing mouse brain. Boca Raton, CRC Press.

Jhanwar-Uniyal, M., B. Beck, Y. S. Jhanwar and C. Bulet (1993). "Neuropeptide Y projection from arcuate nucleus to parvocellular division of paraventricular nucleus: specific relation to the ingestion of carbohydrate." BRAIN RESEARCH **631**(1): 97.

Jiang, H., S. Gallet, P. Klemm, P. Scholl, K. Folz-Donahue, J. Altmüller, J. Alber, C. Heilinger, C. Kukut, A. Loyens, H. Müller-Fielitz, S. Sundaram, M. Schwaninger, V. Prevot and J. C. Brüning (2020). "MCH Neurons Regulate Permeability of the Median Eminence Barrier." Neuron **107**(2): 306-319.

Karim, M. A. and J. C. Sloper (1980). "Histogenesis of the supraoptic and paraventricular neurosecretory cells of the mouse hypothalamus." Journal of Anatomy **130**(Pt 2): 341-347.

Kasher, P., K. Schertz, M. Thomas, A. Jackson, S. Annunziata, M. Ballesta-Martinez, P. Campeau, P. Clayton, J. Eaton, T. Granata, E. Guillén-Navarro, C. Hernando, C. Laverriere, A. Liedén, O. Villa-Marcos, M. McEntagart, A. Nordgren, C. Pantaleoni, C. Pebrel-Richard, C. Sarret, F. Sciacca, R. Wright, B. Kerr, E. Glasgow and S. Banka (2016). "Small 6q16.1 Deletions Encompassing POU3F2 Cause Susceptibility to Obesity and Variable Developmental Delay with Intellectual Disability." American Journal of Human Genetics **98**(2): 363.

Kegel, L., E. Aunin, D. Meijer and J. Bermingham (2013). LGI proteins in the nervous system.

Kim, S. H., P. R. Bennett and V. Terzidou (2017). "Advances in the role of oxytocin receptors in human parturition." Molecular and Cellular Endocrinology Molecular and Cellular Endocrinology **449**: 56-63.

Kimura, S., Y. Hara, T. Pineau, P. Fernandez-Salguero, C. H. Fox, J. M. Ward and F. J. Gonzalez (1996). "The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary." Genes & development **10**(1): 60-69.

Kirilly, D., Y. Gu, Y. Huang, Z. Wu, A. Bashirullah, B. C. Low, A. L. Kolodkin, H. Wang and F. Yu (2009). "A genetic pathway composed of Sox14 and Mical governs severing of dendrites during pruning." Nature neuroscience **12**(12): 1497-1505.

Konturek, S. J., J. W. Konturek, T. Pawlik and T. Brzozowski (2004). "Brain-gut axis and its role in the control of food intake." Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society **55**(1): 137-154.

Lam, B. Y. H., I. Cimino, J. Poley-Wolf, S. Nicole Kohnke, D. Rimmington, V. Iyemere, N. Heeley, C. Cossetti, R. Schulte, L. R. Saraiva, D. W. Logan, C. Blouet, S. O'Rahilly, A. P. Coll and G. S. H. Yeo (2017). "Heterogeneity of hypothalamic pro-opiomelanocortin-expressing neurons revealed by single-cell RNA sequencing." MOLMET Molecular Metabolism **6**(5): 383-392.

Larder, R., D. D. Clark, N. L. G. Miller and P. L. Mellon (2011). "Hypothalamic Dysregulation and Infertility in Mice Lacking the Homeodomain Protein Six6." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **31**(2): 426-438.

Ma, Y., R. Ratnasabapathy, C. Izzi-Engbeaya, M.-S. Nguyen-Tu, E. Richardson, S. Hussain, I. De Backer, C. Holton, M. Norton, G. Carrat, B. Schwappach, G. A. Rutter, W. S. Dhillon and J. Gardiner (2018). "Hypothalamic arcuate nucleus glucokinase regulates insulin secretion and glucose homeostasis." Diabetes, obesity & metabolism **20**(9): 2246-2254.

Marion, J. F., C. Yang, A. Caqueret, F. Boucher and J. L. Michaud (2005). "Sim1 and Sim2 are required for the correct targeting of mammillary body axons." DEVELOPMENT -CAMBRIDGE- **132**(24): 5527-5537.

McClellan, K. M., K. L. Parker and S. Tobet (2006). "Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus." Frontiers in neuroendocrinology **27**(2): 193-209.

Meyer-Lindenberg, A., P. Kirsch, G. Domes and M. Heinrichs (2011). "Oxytocin and vasopressin in the human brain: Social neuropeptides for translational medicine." Nat. Rev. Neurosci. Nature Reviews Neuroscience **12**(9): 524-538.

Michaud, J. L. (2001). "Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus." Human Molecular Genetics **10**(14): 1465-1473.

Michaud, J. L., C. DeRossi, N. R. May, B. C. Holdener and C.-M. Fan (2000). "ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus." Mechanisms of Development **90**(2): 253-261.

Michaud, J. L., T. Rosenquist, N. R. May and C. M. Fan (1998). "Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1." Genes & Development **12**(20): 3264-3275.

Miczek, K. A. and A. Meyer-Lindenberg (2014). "Neuroscience of Aggression."

Mire, E., M. Hocine, E. Bazellieres, T. Jungas, A. Davy, S. Chauvet and F. Mann (2018). "Developmental Upregulation of Ephrin-B1 Silences Sema3C/Neuropilin-1 Signaling during Post-crossing Navigation of Corpus Callosum Axons." CURBIO Current Biology **28**(11): 1768-1782.e1764.

Moir, L., E. G. Bochukova, R. Dumbell, G. Banks, R. S. Bains, P. M. Nolan, C. Scudamore, M. Simon, K. A. Watson, J. Keogh, E. Henning, A. Hendricks, S. O'Rahilly, I. Barroso, A. E. Sullivan, D. C. Bersten, M. L. Whitelaw, S. Kirsch, E. Bentley, I. S. Farooqi and R. D. Cox (2017). "Disruption of the homeodomain transcription factor orthopedia homeobox (Otp) is associated with obesity and anxiety." Molecular metabolism **6**(11): 1419-1428.

Morrison, S. F. and K. Nakamura (2011). "Central neural pathways for thermoregulation." Frontiers in bioscience : a journal and virtual library **16**: 74-104.

Morrison, S. F. and K. Nakamura (2019). "Central Mechanisms for Thermoregulation." Annual review of physiology **81**: 285-308.

Nakai, S., H. Kawano, T. Yodate, M. Nishi, J. Kuno, A. Nagata, K. Jishage, H. Hamada, H. Fujii and K. Kawamura (1995). "The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse." Genes & Development **9**(24): 3109-3121.

Okamura, H., K. Fukui, E. Koyama, H. L. O. Tsutou, T. Tsutou, H. Terubayashi, H. Fujisawa and Y. Iyata (1983). "Time of vasopressin neuron origin in the mouse hypothalamus: examination by combined technique of immunocytochemistry and [3H]thymidine autoradiography." Developmental Brain Research **9**(2): 223-226.

Pabst, O., H. Herbrand, N. Takuma and H. H. Arnold (2000). "NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos." Development genes and evolution **210**(1): 47-50.

Pearson, C. A. and M. Placzek (2013). "Development of the Medial Hypothalamus : Forming a Functional Hypothalamic-Neurohypophyseal Interface." BS:CTDB Current Topics in Developmental Biology **106**: 49-88.

Pickavance, L., S. Dryden, D. Hopkins, C. Bing, H. Frankish, Q. Wang, R. G. Vernon and G. Williams (1996). "Relationships between hypothalamic neuropeptide Y and food intake in the lactating rat." Peptides **17**(4): 577-582.

Prager-Khoutorsky, M., K. Y. Choe, D. I. Levi and C. W. Bourque (2017). "Role of Vasopressin in Rat Models of Salt-Dependent Hypertension." Current hypertension reports **19**(5).

Qin, C., J. Li and K. Tang (2018). "The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases." Endocrinology **159**(9): 3458-3472.

Ranson, R. N., K. Motawei, S. Pyner and J. H. Coote (1998). "The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat that closely appose sympathetic preganglionic neurones projecting to the stellate ganglion." EXPERIMENTAL BRAIN RESEARCH **120**(2): 164-172.

Redila, V., C. Kinzel, Y. S. Jo, C. B. Puryear and S. J. Y. Mizumori (2015). "A role for the lateral dorsal tegmentum in memory and decision neural circuitry." YNLME Neurobiology of Learning and Memory **117**: 93-108.

Roest, P. A. M., R. G. Roberts, S. Sugino, G.-J. B. van Ommen and J. T. den Dunnen (1993). "Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations." Hum Mol Genet Human Molecular Genetics **2**(10): 1719-1721.

Rogol, A. D. (2003). "Growth, body composition and hormonal axes in children and adolescents." J Endocrinol Invest Journal of Endocrinological Investigation : An International Journal **26**(9): 855-860.

Rolls, E. T. (2015). "Limbic systems for emotion and for memory, but no single limbic system." CORTEXX **62**: 119-157.

Ruan, G. X., G. C. Allen, S. Yamazaki and D. G. McMahon (2008). "An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA." PLoS biology **6**(10).

Samson, W. K., M. M. Taylor and J. R. Baker (2003). "Prolactin-releasing peptides." REGPEP</cja:jid> Regulatory Peptides **114**(1): 1-5.

Saper, C. B., A. D. Loewy, L. W. Swanson and W. M. Cowan (1976). "Direct hypothalamo-autonomic connections." Brain research **117**(2): 305-312.

Satoh, A., S.-i. Imai and L. Guarente (2017). "The brain, sirtuins, and ageing." Nat Rev Neurosci Nature Reviews Neuroscience **18**(6): 362-374.

Schauer, C., T. Tong, H. Petitjean, T. Blum, S. Peron, O. Mai, F. Schmitz, U. Boehm and T. Leinders-Zufall (2015). "Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor neurons fire in synchrony with the female reproductive cycle." Journal of Neurophysiology Journal of Neurophysiology **114**(2): 1008-1021.

Schonemann, M. D., A. K. Ryan, R. J. McEvelly, S. M. O'Connell, C. A. Arias, K. A. Kalla, P. Li, P. E. Sawchenko and M. G. Rosenfeld (1995). "Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2." Genes & development. **9**(24): 3122.

Schonemann, M. D., A. K. Ryan, R. J. McEvelly, S. M. O'Connell, C. A. Arias, K. A. Kalla, P. Li, P. E. Sawchenko and M. G. Rosenfeld (1995). "Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2." Genes & development **9**(24): 3122-3135.

Schweitzer, J., H. Lohr, K. Hubscher, W. Driever and J. L. Bonkowsky (2013). "Sim1a and Arnt2 contribute to hypothalamo-spinal axon guidance by regulating Robo2 activity via a Robo3- dependent mechanism." Development Development (Cambridge) **140**(1): 93-106.

Seoane-Collazo, P., J. Fernø, F. Gonzalez, C. Diéguez, R. Leis, R. Nogueiras and M. López (2015). "Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis." Endocrine Endocrine **50**(2): 276-291.

Shell, B., G. E. Farmer, T. P. Nedungadi, L. A. Wang, A. B. Marciante, B. Snyder, R. L. Cunningham and J. T. Cunningham (2019). "Angiotensin type 1a receptors in the median preoptic nucleus support intermittent hypoxia-induced hypertension." American journal of physiology. **316**(5): R651-R651.

Shimada, M. and T. Nakamura (1973). "Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei." YEXNR</cja:jid> Experimental Neurology **41**(1): 163-173.

Sofroniew, M. V., A. Weindl, U. Schrell and R. Wetzstein (1981). "Immunohistochemistry of vasopressin, oxytocin and neurophysin in the hypothalamus and extrahypothalamic regions of the human and primate brain." Acta histochemica. Supplementband **24**: 79-95.

Sussel, L., O. Marin, S. Kimura and J. L. Rubenstein (1999). "Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum." Development **126**(15): 3359-3370.

Swanson, L. W. and H. G. J. M. Kuypers (1980). "The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods." J. Comp. Neurol. The Journal of Comparative Neurology **194**(3): 555-570.

Swanson, L. W. and P. E. Sawchenko (1983). "Hypothalamic Integration: Organization of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei." Annual Review of Neuroscience **6**: 269-324.

Sziklas, V. and M. Petrides (1998). "Memory and the region of the mammillary bodies." Progress in neurobiology **54**(1): 55-70.

Tolson, K. P., C. Garcia, S. Yen, S. Simonds, A. Stefanidis, A. Lawrence, J. T. Smith and A. S. Kauffman (2014). "Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity." The Journal of Clinical Investigation **124**(7): 3075-3079.

Vertes, R. P., Z. Albo and G. Viana Di Prisco (2001). "Theta-rhythmically firing neurons in the anterior thalamus: implications for mnemonic functions of Papez's circuit." Neuroscience **104**(3): 619-625.

Wang, C., Y. He, P. Xu, Y. Yang, K. Saito, Y. Xia, X. Yan, A. Hinton Jr, C. Yan, H. Ding, L. Yu, G. Shu, R. Gupta, Q. Wu, Q. Tong, W. R. Lagor, E. R. Flores and Y. Xu (2018). "TA63 contributes to sexual dimorphism in POMC neuron functions and energy homeostasis." Nature Communications **9**.

Wang, W. and T. Lufkin (2000). "The Murine Otp Homeobox Gene Plays an Essential Role in the Specification of Neuronal Cell Lineages in the Developing Hypothalamus." DEVELOPMENTAL BIOLOGY -ACADEMIC PRESS- **227**: 432-449.

Wasim, M., F. R. Awan, S. S. Najam, A. R. Khan, H. N. Khan and SpringerLink (2016). "Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity."

Wilson, S. W. and C. Houart (2004). "Early steps in the development of the forebrain." Developmental cell **6**(2): 167-181.

Xu, C. and C. M. Fan (2007). "Allocation of paraventricular and supraoptic neurons requires Sim1 function: a role for a Sim1 downstream gene PlexinC1." Molecular endocrinology (Baltimore, Md.) **21**(5): 1234-1245.

Zaman, T., X. Zhou, N. R. Pandey, Z. Qin, K. Keyhanian, K. Wen, R. D. Courtney, A. F. R. Stewart and H.-H. Chen (2014). "LMO4 Is Essential for Paraventricular Hypothalamic Neuronal Activity and Calcium Channel Expression to Prevent Hyperphagia." The Journal of Neuroscience **34**(1): 140-148.

Zheng, W. P. and R. A. Flavell (1997). "The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells." CELL -CAMBRIDGE MA- **89**(4): 587-596.

ANNEXE 1



Figure 28. Génération de la lignée mutante pour *Otp* avec la technologie CrispR-cas9. Les séquences en mauve représentent les trois paires de guides ARN que nous avons utilisé comme référence pour pouvoir retirer l'exon 2 représenté en bleu.

ANNEXE 2

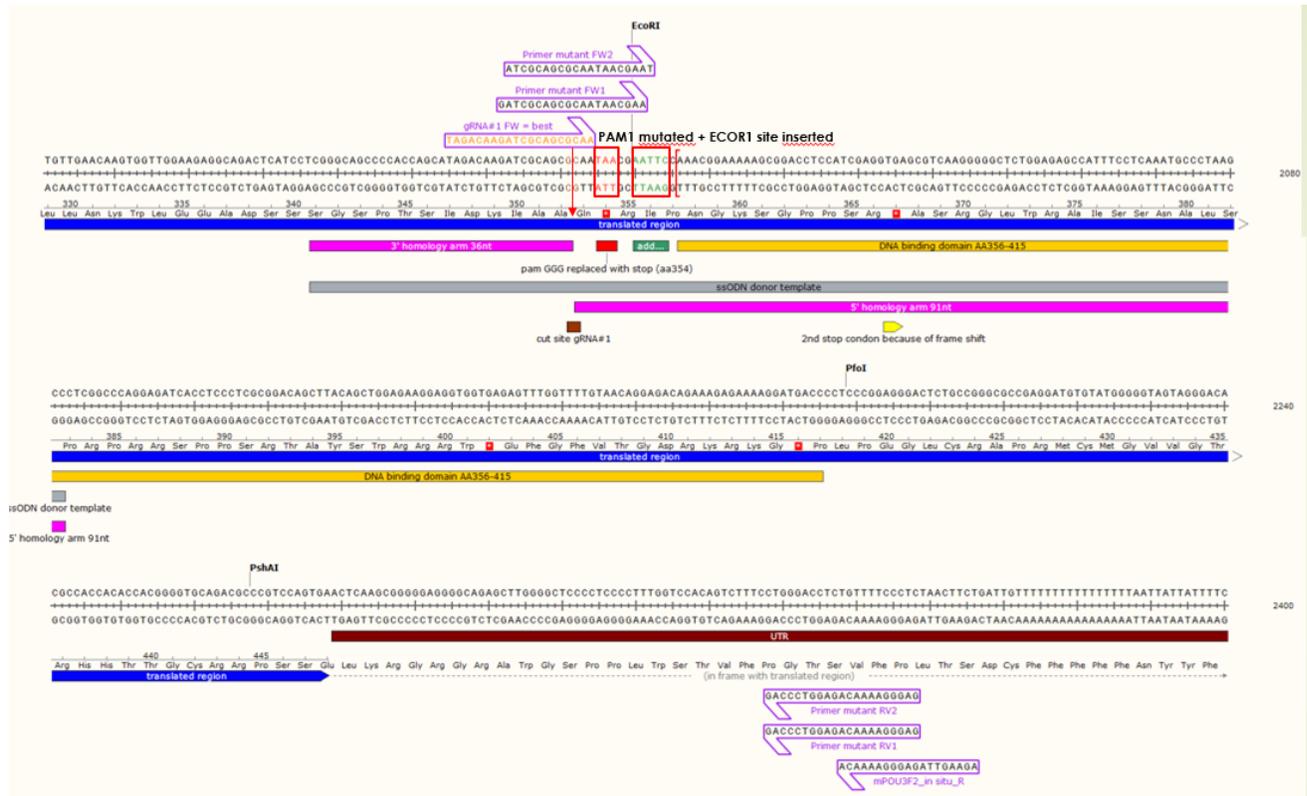


Figure 29. Génération de lignée mutante pour le gène Pou3f2/Brn2 à l'aide de la technologie CrispR-cas9.

Les flèches mauves représentent les guides ARN utilisés par l'enzyme pour couper les deux brins d'ADN. La région jaune représente le domaine de liaison à l'ADN.