

Université de Montréal

Dissection du programme développemental du noyau paraventriculaire de
l'hypothalamus.

Par
Aurore Caqueret

Département de Biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de *philosophiæ doctor* (Ph.D.)
En biochimie

Mars 2009

© Aurore Caqueret, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Dissection du programme développemental du noyau paraventriculaire de
l'hypothalamus.

présentée par :
Aurore Caqueret

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Muriel Aubry, président-rapporteur

Dr Jacques L. Michaud, directeur de recherche

Dr Daniel Sinnett, membre du jury

Dr Aimee Ryan, examinateur externe

Dr Stéphane Roy, représentant du doyen

Résumé

Une cascade de facteurs de transcription composée de SIM1, ARNT2, OTP, BRN2 et SIM2 est requise pour la différenciation des cinq types cellulaires qui peuplent le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus, un régulateur critique de plusieurs processus physiologiques essentiels à la survie. De plus, l'haploinsuffisance de *Sim1* est aussi une cause d'hyperphagie isolée chez la souris et chez l'homme. Nous désirons disséquer le programme développemental du PVN, via une approche intégrative, afin d'identifier de nouveaux gènes qui ont le potentiel de réguler l'homéostasie chez l'individu adulte.

Premièrement, nous avons utilisé une approche incluant l'analyse du transcriptome du PVN à différents stades du développement de la souris pour identifier de tels gènes. Nous avons comparé les transcriptomes de l'hypothalamus antérieur chez des embryons de souris *Sim1*^{+/+} et *Sim1*^{-/-} à E12.5 issus de la même portée. De cette manière, nous avons identifié 56 gènes agissant en aval de *Sim1* dont 5 facteurs de transcription - *Irx3*, *Sax1*, *Rxrg*, *Rora* et *Neurod6*. Nous avons également proposé un modèle de développement à deux couches de l'hypothalamus antérieur. Selon ce modèle, les gènes qui occupent un domaine médial dans la zone du manteau caractérisent des cellules qui peupleront le PVN alors que les gènes qui ont une expression latérale identifient des cellules qui donneront plus tard naissance aux structures ventrolatérales de l'hypothalamus. Nous avons aussi démontré que *Sim1* est impliqué à la fois dans la différenciation, la migration et la prolifération des neurones qui peuplent le PVN tout comme *Otp*. Nous avons également isolé par microdissection au laser le PVN et l'hypothalamus médiobasal chez des souris de type sauvage à E14.5 pour en comparer les transcriptomes. Ceci nous a permis d'identifier 34 facteurs de transcription spécifiques au PVN et 76 facteurs spécifiques à l'hypothalamus médiobasal. Ces gènes représentent des régulateurs potentiels du développement hypothalamique.

Deuxièmement, nous avons identifié 3 blocs de séquences au sein de la région 5' d'*Otp* qui sont conservés chez l'homme, la souris et le poisson. Nous avons construit un transgène qui est composé d'un fragment de 7 kb contenant ces blocs de séquences et d'un gène rapporteur. L'analyse de 4 lignées de souris a montré que ce transgène est uniquement exprimé dans le PVN en développement. Nous avons généré un deuxième transgène dans lequel le fragment de 7 kb est inséré en amont de l'ADNc de *Brn2* ou *Sim1* et de *Gfp*. Nous avons obtenu quatre lignées de souris dans lesquels le profil d'expression de *Brn2* et de *Gfp* reproduit celui d'*Otp*. Nous étudierons le développement du PVN et la prise alimentaire chez ces souris. En parallèle, nous croisons ces lignées avec les souris déficientes en *Sim1* pour déterminer si l'expression de *Brn2* permet le développement des cellules du PVN en absence de *Sim1*. En résumé, nous avons généré le premier transgène qui est exprimé spécifiquement dans le PVN. Ce transgène constitue un outil critique pour la dissection du programme développemental de l'hypothalamus.

Troisièmement, nous avons caractérisé le développement de l'hypothalamus antérieur chez l'embryon de poulet qui représente un modèle intéressant pour réaliser des études de perte et de gain de fonction au cours du développement de cette structure. Il faut souligner que le modèle de développement à deux couches de l'hypothalamus antérieur semble être conservé chez l'embryon de poulet où il est aussi possible de classer les gènes selon leur profil d'expression médio-latéral et le devenir des régions qu'ils définissent.

Finalement, nous croyons que cette approche intégrative nous permettra d'identifier et de caractériser des régulateurs du développement du PVN qui pourront potentiellement être associés à des pathologies chez l'adulte telles que l'obésité ou l'hypertension.

Mots clés : *Sim1*, *Otp*, *Brn2*, facteurs de transcription, noyau paraventriculaire (PVN), hypothalamus, promoteur, transgénèse, embryon de poulet, développement.

Summary

A cascade of transcription factors composed of SIM1, ARNT2, OTP, BRN2 and SIM2 is required for the differentiation of the five major cell types populating the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus, a critical integrator of several homeostatic processes that are required for the survival of vertebrates. Haploinsufficiency of *Sim1* also causes isolated hyperphagia in mice and humans. The goal of our study is to dissect the developmental program of the PVN using an integrative approach in order to identify new genes that could potentially be implicated in the regulation of homeostasis in adults.

First, we used a comparative approach to analyse the PVN transcriptome at different developmental stages in mice embryos in order to identify new genes implicated in PVN development. We compared gene expression in the anterior hypothalamus of E12.5 *Sim1*^{-/-} and *Sim1*^{+/+} littermate embryos using a microarray approach. We identified 56 genes acting downstream of *Sim1* including 5 transcription factors - *Irx3*, *Sax1*, *Rxrg*, *Rora* and *Neurod6*. We proposed a model for the development of the anterior hypothalamus. In this model, the genes expressed in the medial domain of the mantle layer characterise cells that will form the PVN and genes expressed in the lateral domain identify cells that will give rise to ventrolateral areas of the hypothalamus. We also showed that *Sim1*, like *Otp*, is implicated in the differentiation, migration and proliferation of the neurons populating the PVN. Furthermore, we have isolated by laser captured microdissection the PVN and ARC nucleus in wild type mice at E14.5 and compared their transcriptomes. This technique allowed us to identify 34 transcription factors specific to the PVN and 76 factors specific to the ARC. These genes represent potential regulators of hypothalamic development.

Second, we identified 3 blocks of sequence in the 5' region of *Otp* that are conserved between human, mouse and fish. We constructed a transgene which included a 7 Kb fragment encompassing these sequences followed by a reporter gene. The

analysis of 4 mice strains showed that this transgene is specifically expressed in the prospective PVN. We have generated a second transgene in which the 7 Kb fragment is located upstream of the cDNA encoding *Brn2* or *Sim1* and *Gfp*. We obtained 4 mice strains in which the *Brn2* and *Gfp* expression pattern is similar to the *Otp* expression pattern. These mice will be used to study PVN development and food intake. Also, to determine if *Brn2* expression only – without *Sim1* gene expression - allows the development of PVN cells, we are presently crossing these mice with *Sim1* deficient mice. In conclusion, we have generated the first transgene that is specifically expressed in the PVN. This transgene constitutes a critical tool for dissecting the developmental program of the hypothalamus.

Third, we have characterised the development of the anterior hypothalamus of chick embryos which represent an interesting model for loss and gain of function experiments during the development of this brain region. Interestingly, our proposed model for the development of the anterior hypothalamus seems to be conserved in chick embryos. As a matter of fact, it is possible to classify genes according to their medio-lateral expression patterns and the outcome of the regions that they are defining.

Finally, we believe that this integrative approach will allow us to identify and characterize factors implicated in PVN development. From a clinical point of view, these factors could potentially be associated with pathologies such as obesity or arterial hypertension.

Key Words : *Sim1*, *Otp*, *Brn2*, transcription factor, paraventricular nucleus (PVN), hypothalamus, promoter, transgenesis, chick embryo, development.

TABLE DES MATIÈRES

<i>Résumé</i>	<i>III</i>
<i>Table des matières</i>	<i>VII</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>XIII</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>XIV</i>
<i>Liste des abbréviations</i>	<i>XVII</i>
<i>Liste des abbréviations neuroanatomiques</i>	<i>XVIII</i>
<i>Dédicace</i>	<i>XIX</i>
<i>Remerciements</i>	<i>XX</i>
CHAPITRE I : Introduction générale	1
<i>1. L'hypothalamus</i>	<i>2</i>
1.1 Généralités.....	2
1.2 Organisation et composition de l'hypothalamus.....	2
<i>2. Développement précoce de l'hypothalamus</i>	<i>3</i>
2.1 Acquisition du devenir hypothalamique : rôles de SHH et BMP7.	7
2.2 Spécification et migration des précurseurs hypothalamiques : Action précoce de NODAL.....	9
2.3 L'acquisition du devenir hypothalamique nécessite l'inhibition de la voie de signalisation des WNTs.	12
2.4 Intégration des différentes voies de signalisation dans le développement précoce de l'hypothalamus.	15
2.5 Développement tardif de l'hypothalamus prospectif: régionalisation antéro-postérieure et dorsoventrale au sein de cette structure.....	15
2.5.1 Spécification de l'hypothalamus postérieur : rôle de WNT.....	16
2.5.2 Spécification de l'hypothalamus antéro-dorsal : rôle de SHH.....	17
2.5.3 Spécification de l'hypothalamus postéro-latéral : rôle de SHH et BMP7. .	17
2.5.4 Spécification de l'hypothalamus postéro-ventral : rôle de NODAL et de BMP7.	18

2.6 La neurogenèse au cours du développement de l'hypothalamus.....	20
3. <i>Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus</i>	22
3.1 Composition cellulaire et fonctions du PVN.....	23
4. <i>Développement du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus</i>	24
4.1 Cascade de facteurs de transcription contrôlant le développement du PVN.	25
5. <i>Les facteurs de transcription de la famille des bHLH-PAS</i>	28
5.1 Fonctions transcriptionnelles de SIM1 et SIM2.....	30
5.2 <i>Single-minded</i> , régulateur du développement neuronal chez la drosophile.....	31
5.3 <i>Sim1</i> et <i>Sim2</i> , leurs fonctions dans l'hypothalamus en développement.....	32
5.4 <i>Sim1</i> , sa fonction dans l'hypothalamus adulte.....	34
6. <i>Le facteur de transcription OTP</i>	36
6.1 Implication d'OTP au cours du développement de l'hypothalamus.....	37
6.2 Régulation d'OTP au cours du développement de l'hypothalamus.....	39
7. <i>Sim1, Otp et Arnt2 voient leurs fonctions conservées au cours de l'évolution</i>	41
8. <i>Le facteur de transcription BRN2</i>	42
9. <i>Hypothèses et objectifs</i>	44
CHAPITRE II: Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo.....	45
<i>Contribution</i> :.....	47
<i>Introduction</i>	49
<i>Results and discussion</i>	50
<i>Experimental Procedures</i>	54
Cloning of Chick Probes.....	54
In Situ Hybridization.....	55
<i>Acknowledgements</i>	55
<i>References</i> :.....	56
CHAPITRE III: Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus..	69

<i>Contribution</i> :	71
<i>Introduction</i>	73
<i>Methods</i>	74
Mice and embryos	74
Microarray studies	75
BrdU labeling, TUNEL assay, LacZ staining and in situ hybridization	75
<i>Results</i>	76
Gene expression profiling of the developing anterior hypothalamus	76
Molecular characterization of the developing anterior hypothalamus	78
Waves of neurogenesis in the developing anterior hypothalamus	80
Fate of medial and lateral domains of the anterior hypothalamus in <i>Sim1</i> ^{+/+} and <i>Sim1</i> ^{-/-} embryos	81
<i>Discussion</i>	82
Laminar organization of the developing anterior hypothalamus	83
Convergent pathways for the development of the anterior hypothalamus	85
<i>Acknowledgments</i>	87
<i>References</i> :	88
 CHAPITRE IV: Caractérisation d'un transgène permettant une expression spécifique au sein du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus en développement	 108
<i>Introduction</i> :	109
<i>Résultats et Discussion</i> :	109
<i>Matériel et Méthodes</i> :	113
Analyse bioinformatique	113
Construction des vecteurs OTP5-LacZ et OTP7-LacZ et transgénèse transitoire	113
Construction des vecteurs OTP7-Sim1 et OTP7-Brn2 et établissement des lignées stables	114
Analyse du phénotype des lignées stables	115

<i>Références:</i>	116
CHAPITRE V: Établissement du transcriptome des noyaux paraventriculaire et arqué de l'hypothalamus au 14eme jour embryonnaire chez la souris.....	124
<i>Introduction</i>	125
<i>Résultats et Discussion</i> :	126
<i>Matériel et Méthodes</i> :	128
Embryons de souris.....	128
Microdissection au laser.....	128
Micropuces.....	129
Hybridation <i>in situ</i>	130
<i>Références:</i>	131
CHAPITRE VI: Intégration des différents facteurs de transcription spécifiques au PVN.	142
CHAPITRE VII: Discussion.....	152
<i>L'importance d'une cascade de facteurs de transcription pour assurer le développement du PVN.</i>	153
Conservation de la cascade entre espèces.	153
Facteurs agissant en amont de cette cascade.....	153
Caractérisation de la région promotrice d' <i>Otp</i>	154
<i>Convergence des voies, relations entre les différents effecteurs de cette cascade. ..</i>	155
<i>Sim1</i> et <i>Otp</i> sont requis pour la différenciation et la migration des neurones peuplant le PVN et le SON.	155
<i>Sim1</i> et <i>Otp</i> sont également impliqués dans la prolifération des neurones peuplant le PVN et le SON.	155
Relation entre <i>Sim1</i> et <i>Sim2</i> au cours du développement hypothalamique.....	156
<i>Sim2</i> et <i>Brn2</i> , deux facteurs de transcription assurant la différenciation des cinq types cellulaires majeurs composant le PVN/SON.....	157
Fonctions de <i>Brn2</i> au cours du développement du PVN/SON.	158

<i>Établissement du transcriptome du PVN en développement via une approche intégrative.</i>	159
Établissement du transcriptome à E12.5 et identification des gènes agissant en aval de <i>Sim1</i>	159
Établissement du transcriptome du PVN à E14.5	163
Établissement du transcriptome de l'ARC à E14.5.....	165
Intégration des bases de données pour tirer profit de ces résultats.	166
<i>Conclusion</i>	166
<i>Références:</i>	168
 CHAPITRE VIII: Annexe I: <i>Sim1</i> and <i>Sim2</i> are required for the correct targeting of mammillary body axons.....	180
<i>Introduction</i>	184
<i>Materials and methods</i>	186
Generation of the <i>Sim1</i> ^{tlz} allele.....	186
Genotyping of mice.....	187
Histology, in situ hybridization, β -galactosidase staining and DiI labelling	188
<i>Results</i>	188
Development of mammillary body projections requires <i>Sim1</i> and <i>Sim2</i>	188
A <i>Sim1</i> ^{tlacz} allele allows staining of mammillary body axons.....	190
<i>Sim1/Sim2</i> mutant axons are directed towards the midline.....	191
<i>Sim1/Sim2</i> mutant neurons are generated and survive until E18.5	192
<i>Sim1</i> and <i>Sim2</i> upregulate <i>Rig-1/Robo3</i> expression in the developing mammillary body.....	193
<i>Discussion</i>	195
Requirement of <i>Sim1</i> and <i>Sim2</i> for MB axonal development.....	195
Cascade of transcription factors controlling MB development.....	197
Respective functions of bHLH-PAS proteins during MB development.....	198
<i>Acknowledgments</i>	200

<i>References:</i>	201
Annexe II: Looking for Trouble: A Search for Developmental Defects of the Hypothalamus.	227
<i>Abstract</i>	229
<i>Introduction</i>	230
Patterning of the Hypothalamus by Extrinsic Signals	230
Transcriptional Control of Cell-Type Specification in the Hypothalamus.....	232
Paraventricular and Supraoptic Nuclei	232
Arcuate Nucleus.....	233
Ventromedial Nucleus.....	234
Physiological Relevance of Transcriptional Regulators of Hypothalamus	
Development.....	234
Establishment of Circuitries.....	236
Imprinting and Hypothalamic Development.....	238
<i>Conclusion</i>	240
<i>References:</i>	241

Liste des tableaux

Table 1. Sequences of Chick Probes.....	58
Table 1. Decreased transcripts in the anterior hypothalamus of E12.5 <i>Sim1</i> ^{-/-} mouse embryos.....	92
Table 2. Increased transcripts in the anterior hypothalamus of E12.5 <i>Sim1</i> ^{-/-} mouse embryos.....	93
Tableau 1. Facteurs de transcription, régulateurs du développement du système nerveux et hormones exprimés spécifiquement au sein du PVN en développement d'embryons de souris à E14.5.....	135
Tableau 2. Facteurs de transcription, régulateurs du développement du système nerveux et hormones spécifiquement exprimés au sein de l'ARC en développement d'embryons de souris à E14.5.....	137
Tableau 1. Gènes analysés par hybridation <i>in situ</i>	143

Liste des figures

Figure I-1. Schéma d'une vue à l'horizontale du cerveau représentant les différents noyaux de l'hypothalamus	3
Figure I-2. Modèle prosomérique de Puellas et Rubenstein.	5
Figure I-3. Développement précoce de l'hypothalamus.	7
Figure I-4. L'action coordonnée de <i>Shh</i> , <i>Bmp7</i> et <i>Chordin</i> , exprimés par le mésoderme axial, est essentielle à l'induction des progéniteurs hypothalamiques qui expriment <i>Nkx2.1</i>	9
Figure I-5. NODAL est essentiel à l'expression de <i>Nkx2.1</i> dans le diencephale ventral et passerait par l'action de <i>Shh</i>	11
Figure I-6. Principaux médiateurs de la voie de signalisation des.....	13
Figure I-7. Le gradient de signalisation antéro-postérieur des.....	14
Figure I-8. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régionalisation antéro-postérieure et dorso-ventrale de l'hypothalamus.	20
Figure I-9. Plusieurs mécanismes de migration radiale et tangentielle ont lieu au cours de la neurogenèse de l'hypothalamus.	22
Figure I-10. Le PVN, ses types cellulaires et ses projections axonales.	24
Figure I-11. Modèle proposé par Xu, C. et Fan, C. M. 2007 pour la migration des neurones magnocellulaires vers le SON.	27
Figure I-12. Cascade de facteurs de transcription régulant la différenciation des cinq types cellulaires majeurs qui peuplent le PVN.	28
Figure I-13. Coloration LacZ des projections axonales dérivant des corps mammillaires chez les embryons de souris E14.5 de type sauvage et mutants pour <i>Sim1/Sim2</i>	34
Figure I-14. Régulation de l'équilibre énergétique par un circuit hypothalamique.	36
Figure I-15. Cascade de facteurs de transcription requise pour la différenciation cellulaire au sein du noyau arqué.	38
Figure I-16. Régulateurs de l'expression d' <i>Otp1</i> au cours du développement de l'hypothalamus chez le poisson-zèbre.	41
Figure II-1. Expression of <i>Sim1</i> , <i>Sim2</i> , and <i>Otp</i> in the hypothalamus of Hamburger and Hamilton stage (HH) 14 chick embryo.	60

Figure II-2. Expression of transcription factors and markers of terminal differentiation in Hamburger and Hamilton stage (HH) 20 hypothalamus.....	62
Figure II-3. Expression of transcription factors and markers of terminal differentiation in Hamburger and Hamilton stage (HH) 26 hypothalamus.....	64
Figure II-4. Expression of transcription factors and markers of terminal differentiation in the nucleus of Edinger-Westphal of HH26 chick embryo.	66
Figure II-5. Expression of transcription factors and markers of terminal differentiation in Hamburger and Hamilton stage (HH) 40 hypothalamus.....	68
Figure III-1. Microarray analysis of the anterior hypothalamus of <i>Sim1</i> ^{+/+} and <i>Sim1</i> ^{-/-} embryos.....	95
Figure III-2. Validation of microarray results using <i>in situ</i> hybridization.....	97
Figure III-3. Lamination of the anterior hypothalamus at E11.0.....	99
Figure III-4. Lamination of the anterior hypothalamus at E11.5.....	101
Figure III-5. Lamination of the anterior hypothalamus at E12.5 and E13.5.....	103
Figure III-6. BrdU incorporation in <i>Sim1</i> ^{+/+} and <i>Sim1</i> ^{-/-} embryos.....	105
Figure III-7. Marker analysis of the anterior hypothalamus at late embryonic stages...	107
Figure IV-1. Identification des éléments conservés entre espèces dans la région promotrice du gène <i>Otp</i>	119
Figure IV-2. Caractérisation par transgénèse transitoire des éléments conservés dans le promoteur d' <i>Otp</i>	121
Figure IV-3. Établissement des lignées stables pour les transgènes OTP7-LacZ, OTP7-Sim1 et OTP7-Brn2.	123
Figure V-1. Analyse du transcriptome du PVN et de l'hypothalamus médiobasal.	134
Figure V-2. Validation des résultats des micropuces par hybridation <i>in situ</i>	141
Figure VI-1. Expression d' <i>Irx3</i> et <i>Irx5</i> dans l'hypothalamus antérieur à E12.5 d'embryons de souris <i>Sim1</i> ^{+/+} et <i>Sim1</i> ^{-/-}	147
Figure VI-2. Patrons d'expression, étudiés par hybridation <i>in situ</i> , de différents gènes au sein de l'hypothalamus antérieur à E12.5.	149
Figure VI-3. Patron d'expression des gènes de la famille <i>Lhx</i> dans l'hypothalamus antérieur à E12.5 et E14.5.....	151

Figure VII-1. Modèle de développement à deux couches de l'hypothalamus antérieur.	162
Figure VIII-annexe-I-1. Co-expression of <i>Sim1</i> and <i>Sim2</i> in the developing mammillary body.....	208
Figure VIII-annexe-I-2. Organization of the mammillary body projections.	210
Figure VIII-annexe-I-3. MTEG and MTT development affected by <i>Sim1/Sim2</i> gene dosage.....	212
Figure VIII-annexe-I-4. Creation of a <i>Sim1</i> allele expressing <i>Tau-lacZ</i>	214
Figure VIII-annexe-I-5. β -galactosidase staining of mammillary body axonal projections in E14.5 <i>Sim1/Sim2</i> mutant embryos.	216
Figure VIII-annexe-I-6. Abnormal targeting of mammillary body axons as revealed by DiI labelling.	218
Figure VIII-annexe-I-7. β -galactosidase staining of mammillary body axonal projections in E11.5 <i>Sim1/Sim2</i> mutant embryos.	220
Figure VIII-annexe-I-8. Loss of <i>Foxb1</i> expression in E12.5 <i>Sim1/Sim2</i> double mutants.	222
Figure VIII-annexe-I-9. Mammillary body neurons survive until the end of gestation in <i>Sim1/Sim2</i> double mutants.	224
Figure VIII-annexe-I-10. <i>Sim1</i> and <i>Sim2</i> repress <i>Rig-1/Robo3</i> expression in the developing mammillary body.	226
Figure VIII-annexe-II-1. Structural and functional relationship between hypothalamic nuclei.....	251
Figure VIII-annexe-II-2. Transcriptional regulation of anterior hypothalamic development.....	253
Figure VIII-annexe-II-3. Transcriptional regulation of arcuate nucleus development. .	255

Liste des abbréviations

ACTH : Adrénocorticotropine

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AHR : *Arylhydrocarbon receptor*

ARNm : Acide ribonucléique messenger

AVP : Arginine vasopressine

bHLH : *Basic helix-loop-helix domain*

BMP : *Bone morphogenetic protein*

BrdU : 5'-bromo-2'-deoxyuridine

Brn2 : *Brain-2*

CME : *Central midline element*

CRH : Hormone de libération de la corticotropine

GFP : *Green Fluorescent Protein*

HIF: *Hypoxia inducible factor*

HIS: Hybridation *in situ*

IRES : *Internal Ribosomal Entry Site*

LacZ: β -galactosidase

LMV : Ligne médiane ventrale

OT : Oxytocine

OTP : *Orthopedia*

ML : Microdissection au laser

NPY : Neuropeptide Y

PAS : Per, Arnt, Sim domaine d'homologie

POMC : Propiomélanocortine

PPC : Plaque préchordale

SIM1 : *Single-minded 1*

SIT : Site d'initiation de la transcription

SNA : Système nerveux autonome

SNC : Système nerveux central

SS : Somatostatine

TGF- β : *Transforming growth factor β*

TSH: Thyrotropine

TRH : Hormone de libération de la thyrotropine

V : Ventricule

Liste des abréviations neuroanatomiques

AH : Noyau antérieur hypothalamique

aPV : Noyau periventriculaire antérieur

ARC : Noyau arqué

CM : Corps mammillaire

DMH : Noyau dorsomédial hypothalamique

DMV : Noyau moteur dorsal du nerf vague

GI : Tractus gastro-intestinal

LHA : Aire latérale hypothalamique

MTEG : Tractus mammillotegmental

MTT : Tractus mamillothalamique

NTS : Noyau du tractus solitaire

PVN : Noyau paraventriculaire

SCH : Noyau suprachiasmatique

SON : Noyau supraoptique

SNA : Système nerveux autonome

VMH : Noyau ventromédial hypothalamique

ZLI : Zona limitans intrathalamica

À mes parents,

À Nicolas,

À Maxime ou à Chloé, seul l'avenir nous le dira...

Remerciements

Dr Michaud, je vous remercie grandement de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire pour ma maîtrise et mon doctorat. J'ai énormément apprécié votre compétence, votre support et surtout votre humanité. J'ai beaucoup appris à vos côtés. Francine, sans qui je n'aurais sans aucun doute pu accomplir tout ce travail, je te dois un immense merci. Tu m'as été d'une aide précieuse autant au point de vue scientifique que moral. J'ai énormément apprécié ta compagnie qui va sérieusement me manquer! Chun, merci pour ta gentillesse. Tu m'as énormément appris scientifiquement parlant en plus de m'avoir fait pratiquer mon anglais (qui en avait bien besoin!). Jean-François, ce fut un plaisir d'avoir partagé le travail de labo à tes côtés et de te compter aujourd'hui parmi mes amis. Sabine, un immense merci pour ton support. Tu m'as aidé à passer au travers de beaucoup de choses au cours de toutes ces années. Je chérirai toujours ton amitié! Khalil et Lysanne, avec qui j'ai partagé les derniers mois de mon doctorat, ce fut un véritable plaisir que de vous rencontrer et de vous cotoyer. Grâce à chacun d'entre vous, je garderai toujours un excellent souvenir des mes études graduées.

Je voudrais aussi remercier mes parents pour leur support et leurs encouragements. Vous m'avez appris les valeurs essentielles de la vie. Maman, j'admire ton courage et ta force. Merci à Nicolas, mon conjoint, qui a vécu avec moi les hauts et les bas de la vie de labo. Merci d'avoir supportés mes sautes d'humeur, mes moments de démotivation mais aussi les petits moments d'euphories dus aux résultats positifs! J'ai beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés.

Merci aussi à mes ami(e)s, principalement à Renée avec qui je partage des chemins croisés et qui a vécu en même temps que moi la vie de doctorante!

Merci finalement à tous mes collègues de l'hôpital Sainte-Justine et collaborateurs dont j'ai croisé le chemin au cours de ces dernières années et qui m'ont aidé d'une manière au d'une autre à réaliser ce travail.

CHAPITRE I : Introduction générale.

1. L'hypothalamus

1.1 Généralités

L'hypothalamus, situé à l'intersection des systèmes nerveux et endocrinien, est essentiel à la fois à la survie de l'individu (contrôle de l'homéostasie), mais aussi à la survie de l'espèce (contrôle de la reproduction). Plus particulièrement, l'hypothalamus est un intégrateur des réponses endocriniennes, autonomiques et comportementales qui résultent en la régulation de nombreux processus physiologiques comprenant entre autres le rythme circadien, l'appétit et la soif, les comportements sexuels et maternels ainsi que le contrôle de la sécrétion hormonale hypophysaire. La perturbation du développement de l'hypothalamus peut être associée à un déséquilibre de ces différents processus physiologiques résultant en une issue fatale ou en des pathologies affectant la qualité de vie de l'individu atteint comme l'obésité ou l'hypertension artérielle.

1.2 Organisation et composition de l'hypothalamus.

L'hypothalamus, situé au dessus de l'hypophyse, occupe la moitié ventrale du diencéphale entourant le troisième ventricule. Classiquement, l'hypothalamus a été divisé en trois zones longitudinales distinctes (périvericulaire, médiale et latérale) ainsi qu'en quatre régions rostro-caudales (préoptique, supraoptique ou antérieure, tubérale et mammillaire). Il est composé d'une douzaine de noyaux relativement bien définis entrecoupés de régions moins distinctes (Fig. 1; Swanson L. W. 1987). Par ailleurs, plusieurs études physiologiques et génétiques ont permis d'associer à ces différents noyaux des fonctions précises. Par exemple, le noyau suprachiasmatique (SCh) est impliqué dans la régulation du rythme circadien alors que les noyaux paraventriculaire (PVN) et supraoptique (SON) sont associés à la régulation de la sécrétion hypophysaire. L'hypothalamus est également composé d'un système de fibres qui entre et sort de cette structure. Ces différentes projections connectent l'hypothalamus au système endocrinien (hypophyse), au cortex cérébral ainsi qu'au système nerveux autonome (SNA)

permettant l'intégration des stimuli provenant de ces régions et le déclenchement des réponses qui en découlent.

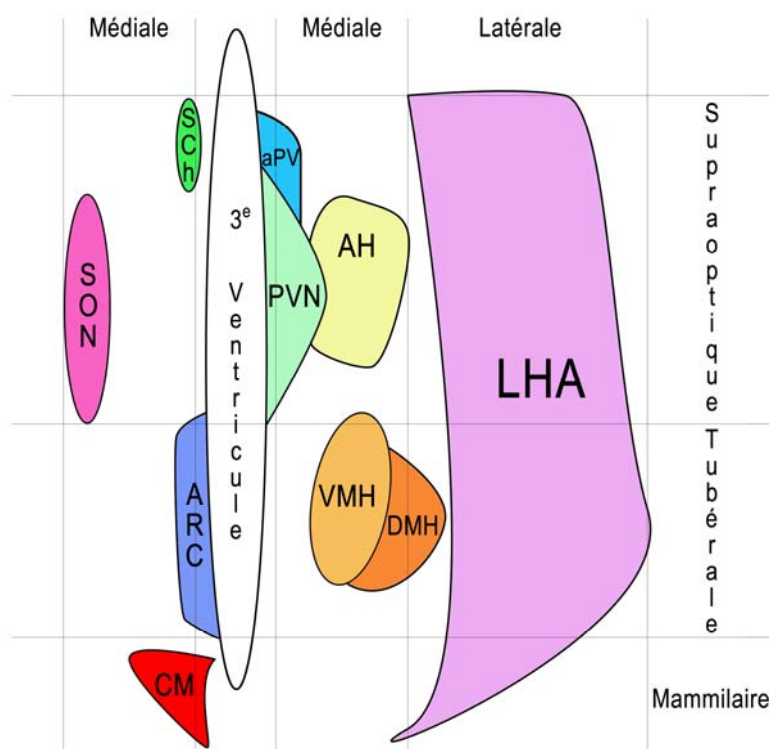


Figure 1. Schéma d'une vue à l'horizontale du cerveau représentant les différents noyaux de l'hypothalamus ainsi que leurs positions longitudinales et rostro-caudales au sein de cette structure. Chaque noyau existe de part et d'autre du 3ème ventricule. Ici, pour la simplicité du schéma, un seul noyau de chaque paire est représenté d'un seul côté du 3ème ventricule. SON : noyau supraoptique, SCh : noyau suprachiasmatique, ARC : noyau arqué, CM : corps mammillaire, aPV : noyau périventriculaire antérieur, PVN : noyau paraventriculaire, AH : noyau antérieur hypothalamique, VMH : noyau ventromédial hypothalamique, DMH : noyau dorsomédial hypothalamique, LHA : aire latérale hypothalamique.

2. Développement précoce de l'hypothalamus.

Les étapes précoces du développement du système nerveux central (SNC) sont largement conservées entre espèces. C'est pourquoi l'utilisation de modèles tels que la souris, le poisson, la grenouille et le poulet est largement employée afin de mettre à jour

les mécanismes qui sous-tendent la morphogenèse et la différenciation cellulaire au sein de cette structure. Au cours du développement, le SNC est divisé en trois vésicules primaires soient le prosencéphale, le mésencéphale et le rhomboencéphale. Le prosencéphale, qui dérive de la plaque neurale antérieure au cours de la gastrulation, se divise ensuite pour former antérieurement le télencéphale et postérieurement le diencephale. Le diencephale donne quand à lui naissance, dans sa partie ventrale, à l'hypothalamus, alors que le diencephale dorsal se compose du préthalamus et du thalamus qui sont tous deux séparés par la *Zona limitans intrathalamica* (ZLI) (Wilson, S. W. and Houart, C. 2004). Puellas et Rubenstein ont développé un modèle du développement du prosencéphale basé sur les prosomères (Rubenstein, J. L. et al. 1994). Les prosomères sont des domaines définis par l'expression différentielle de gènes au cours de la différenciation des différentes structures dérivant du prosencéphale soit le télencéphale, le diencephale, l'hypothalamus et la rétine. Ce modèle est un instrument qui a permis de mettre l'emphase sur la conservation au cours de l'évolution de l'expression moléculaire de certains gènes et de leur interaction pour donner naissance au SNC mature. La partie ventrale des prosomères p4 à p6 donnent naissance à l'hypothalamus (Fig.2).

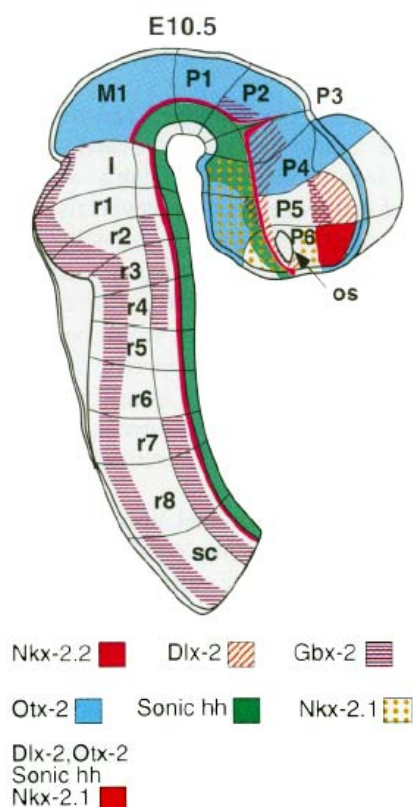


Figure 2. Modèle prosomérique de Puellas et Rubenstein. Les prosomères sont définis par l'expression de six gènes - *Nkx2.2*, *Dlx2*, *Gbx2*, *Otx2*, *Shh* et *Nkx2.1* - impliqués dans le développement précoce du SNC de la souris. Les frontières entre chaque prosomère sont indiquées par une ligne noire. La partie ventrale des prosomères p4 à p6 correspond à l'hypothalamus. *Tirée et adaptée de Rubenstein, J. L. et al. 1994.*

Plus spécifiquement, un petit groupe de cellules situé dans la partie la plus ventrale du tube neurale, les cellules de la ligne médiane ventrale (LMV), semble essentiel au développement de l'hypothalamus (Fig. 3). Les cellules de la LMV sont en effet composées des précurseurs hypothalamiques adjacents aux cellules du plancher neural. Les cellules du plancher neural participent à l'induction et à la régionalisation des neurones et cellules gliales du tube neural postérieur. Des études de devenir cellulaire (*fate-mapping*) ont permis de démontrer chez le poisson-zèbre que les précurseurs hypothalamiques proviennent d'une région caudale au diencephale dorsal prospectif qui est proche de l'organisateur (Dale, K. et al. 1999; Mathieu, J. et al. 2002; Varga, Z. M. et al. 1999). Les précurseurs hypothalamiques et les cellules du plancher neural semblent donc provenir de la même région de l'embryon et partagent des caractéristiques moléculaires semblables dans les stades précoces du développement du SNC (Dale, J. K. et al. 1997; Dale, K. et al. 1999). Toutefois, les précurseurs hypothalamiques doivent migrer rostralement au sein de la plaque neurale pour atteindre leur position finale au sein du SNC et c'est au cours de cette migration qu'ils adoptent leur devenir hypothalamique (Mathieu, J. et al. 2002; Varga, Z. M. et al. 1999; Woo, K. and Fraser, S. E. 1995). Par ailleurs, la limite rostrale des cellules du plancher neural est considérée comme étant située dans le diencephale, ventrale à la ZLI (Wilson, S. W. and Houart, C. 2004). Le développement précoce de l'hypothalamus requiert donc à la fois l'induction de la spécification cellulaire (acquisition de l'identité hypothalamique) ainsi que la migration postéro-antérieure des précurseurs hypothalamiques.

Plusieurs voies de signalisation semblent être responsables de ces deux événements. Par ailleurs, deux modèles sont actuellement acceptés pour expliquer comment les cellules de la LMV se différencient en précurseurs hypothalamiques ou en

cellules du plancher neural (Fig. 3, revus dans Wilson, S. W. and Houart, C. 2004). Le premier modèle propose que des signaux variant selon l'axe antéro-postérieur et originant du mésoderme (plaque préchordale (PPC)) et du mésendoderme axial (notochorde), qui se situent ventralement au tube neural, sont à la source de la différenciation cellulaire distincte entre les précurseurs hypothalamiques et les cellules du plancher neural au sein du tube neural (Dale, K. et al. 1999; Patten, I. et al. 2003). Le deuxième modèle prétend quant à lui que les signaux provenant du mésoderme et du mésendoderme axial sont les mêmes selon l'axe antéro-postérieur mais que c'est la capacité de réponse des cellules de la LMV qui varie selon cet axe. Ces deux modèles ne sont pas incompatibles et il est fort probable que c'est la combinaison d'éléments de ces deux modèles qui est plus proche de la réalité. Quoiqu'il en soit, les signaux candidats permettant la différenciation des précurseurs hypothalamiques sont : *Shh*, *Nodal* (famille des TGF- β : *Transforming growth factor-beta*), BMP (*Bone morphogenetic protein*) et *Wnt*. Ces facteurs ont, d'ailleurs, été impliqués dans le développement de la plupart des régions du SNC.

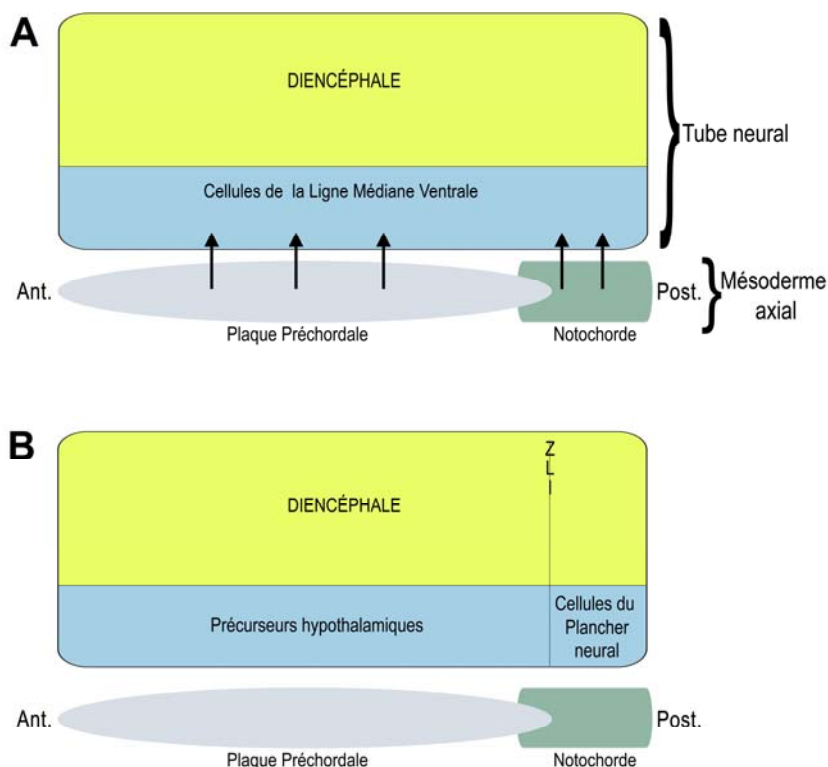


Figure 3. Développement précoce de l'hypothalamus. A) Les cellules de la ligne médiane ventrale sont soumises à des signaux (flèches) provenant de la plaque préchordale et de la notochorde. B) Les cellules de la ligne médiane ventrale adoptent au cours du développement des caractéristiques qui les distinguent en précurseurs hypothalamiques ou en cellules du plancher neural. *ZLI* : *Zona Limitans Intrathalamica*.

2.1 Acquisition du devenir hypothalamique : rôles de SHH et BMP7.

Des études de devenir cellulaire chez le poulet ont mis en évidence que les précurseurs hypothalamiques sont sous l'influence de signaux dynamiques provenant du mésoderme axial tout au cours de leur migration postéro-antérieure. Initialement, les cellules de la LMV sont exposées à de haut niveau d'expression de la glycoprotéine SHH produite par la PPC et la notochorde. De plus, il a été démontré que la perte de fonction de SHH chez la souris résulte en l'absence des structures ventrales du prosencéphale, y compris l'hypothalamus, et en une cyclopie (Chiang, C. et al. 1996). De manière similaire, l'augmentation de l'activité de *Shh* chez le poisson-zèbre conduit à l'expression ectopique des marqueurs hypothalamiques (Rohr, K. B. et al. 2001). Ceci laisse penser que *Shh* pourrait être un signal inducteur pour le développement hypothalamique. Il s'avère que l'exposition des précurseurs hypothalamiques à SHH conduit à l'expression de SHH et du facteur HNF3 β au sein même de ces cellules. Ce phénomène est nécessaire pour établir et maintenir leur caractère ventral (Roelink, H. et al. 1995). *Shh* contrôlerait donc sa propre expression au sein des précurseurs hypothalamiques par une boucle d'autorégulation impliquant HNF3 β qui est une cible directe de SHH en plus d'être un régulateur de l'expression de *Shh*. Toutefois au cours du temps, les précurseurs hypothalamiques perdent l'expression de HNF3 β au profit de BMP7 et de son action rostralisante (Dale, K. et al. 1999). Par ailleurs, BMP7 est également exprimée par la PPC. En effet, la reproduction de ces conditions dans des cultures d'explants de plaque neurale a permis de mettre en évidence que l'action coordonnée de SHH et BMP7 exprimés par la PPC correspond à l'apparition de *Nkx2.1*, un des premiers marqueurs moléculaires des précurseurs hypothalamiques (Dale, J. K. et al. 1997). De plus, SHH et BMP7 sont aussi exprimés par la notochorde sans que celle-

ci ne soit capable d'induire la différenciation des précurseurs hypothalamiques (Dale, K. et al. 1999). En réponse à cette contradiction, des cultures d'explants chez le poulet ont permis de démontrer que la capacité rostralisante de la PPC semble corrélée avec la diminution d'expression de la molécule CHORDIN dans cette structure, diminution qui n'a pas lieu au sein de la notochorde. Or *Chordin* est un antagoniste des BMP et est probablement impliqué dans la régulation négative de BMP7 dans la notochorde expliquant l'incapacité de cette structure à induire la différenciation hypothalamique. De plus, cette inhibition prévient ainsi la différenciation précoce des précurseurs hypothalamiques (avant qu'ils n'aient atteint leur destination finale) et permet également de définir la frontière entre les précurseurs hypothalamiques et les cellules du plancher neural (Dale, K. et al. 1999; Patten, I. and Placzek, M. 2002). En résumé, l'action coordonnée dans le temps et dans l'espace de *Shh*, *Bmp7* et *Chordin*, tous exprimés par le mésoderme axial, est essentielle à l'induction des progéniteurs hypothalamiques du moins chez l'embryon de poulet (Fig. 4). En effet, les embryons de poisson-zèbre mutants pour BMP7 ou surexprimant *Noggin*, un antagoniste des BMPs tout comme *Chordin*, continuent à exprimer *Nkx2.1* laissant penser que l'induction du devenir hypothalamique par l'action combinée de SHH et BMP n'est peut-être pas conservée entre espèces (Barth, K. A. et al. 1999; Rohr, K. B. et al. 2001). Même si ceci n'exclut pas forcément une action des BMPs dans la régionalisation antéro-postérieure des cellules de la LMV, d'autres voies de signalisation jouent possiblement des rôles plus critiques dans la différenciation des cellules hypothalamiques et des cellules du plancher neural chez le poisson zèbre.

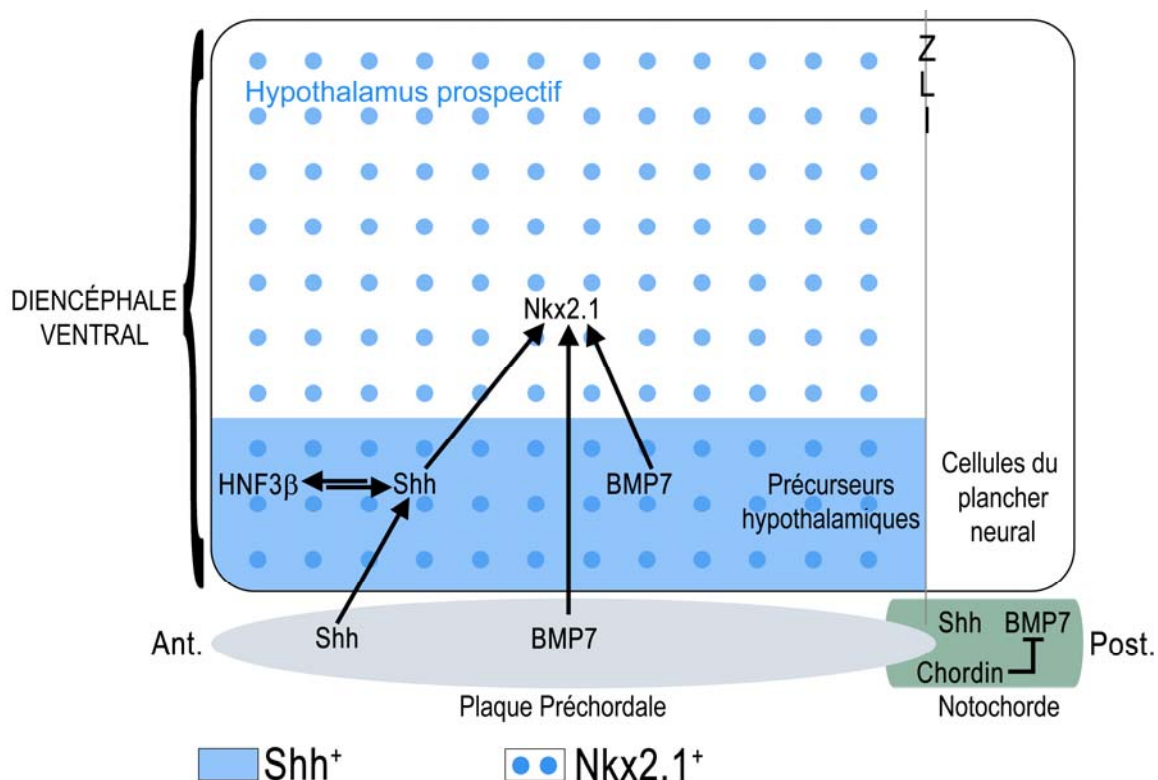


Figure 4. L'action coordonnée de *Shh*, *Bmp7* et *Chordin*, exprimés par le mésoderme axial, est essentielle à l'induction des progéniteurs hypothalamiques qui expriment *Nkx2.1*. Noter que les flèches démontrent l'action des voies de signalisation, mais ne reflètent pas forcément une interaction moléculaire directe. ZLI : *Zona Limitans Intrathalamica*.

2.2 Spécification et migration des précurseurs hypothalamiques : Action précoce de NODAL.

Les mutations associées à des composants de la voie de signalisation de NODAL chez le poisson-zèbre résultent en des phénotypes sévères similaires aux phénotypes des souris mutantes pour *Shh* tels que la cyclopie et l'absence des tissus hypothalamiques (Schier, A. F. and Shen, M. M. 2000). NODAL est un membre de la famille des TGFβ et serait essentiel à la formation du mésoderme chez les vertébrés (Schier, A. F. and Shen, M. M. 2000). L'investigation du rôle de la voie de signalisation de *Nodal* chez le

poisson-zèbre a permis de démontrer que cette voie est essentielle à l'expression de *Nkx2.1* dans le diencéphale ventral et qu'elle passerait par l'action de *Shh* (Fig. 5). En effet, Rohr et al ont démontré que la surexpression de *Shh* induit une expansion du domaine d'expression de *Nkx2.1* chez les embryons de type sauvage. Toutefois chez les embryons mutants pour un membre de la voie de signalisation de NODAL, *Shh* n'est pas suffisant pour récupérer la perte d'expression de *Nkx2.1*, laissant penser que *Shh* seul ne peut permettre l'induction de l'hypothalamus (Rohr, K. B. et al. 2001). En investiguant le rôle de *Ndr2*, aussi nommé *Cyclop* qui est un ligand de NODAL, ceci à l'aide de dominants négatifs et de signaux constitutivement actifs au cours du développement du tube neural ventral chez le poisson-zèbre, il a été démontré que ce dernier régule l'expression de *Shh* dans les cellules neuronales. De plus, le promoteur de *Shh* contient des éléments activateurs répondant à la signalisation par *Cyclop* et permettant l'expression de *Shh* dans le tube neural ventral. Donc en plus, de la boucle d'autorégulation qui maintient l'expression de *Shh* dans les précurseurs hypothalamiques, il y aurait d'autres mécanismes permettant l'initiation de l'expression de *Shh* dans ces cellules, incluant NODAL (Muller, F. et al. 2000).

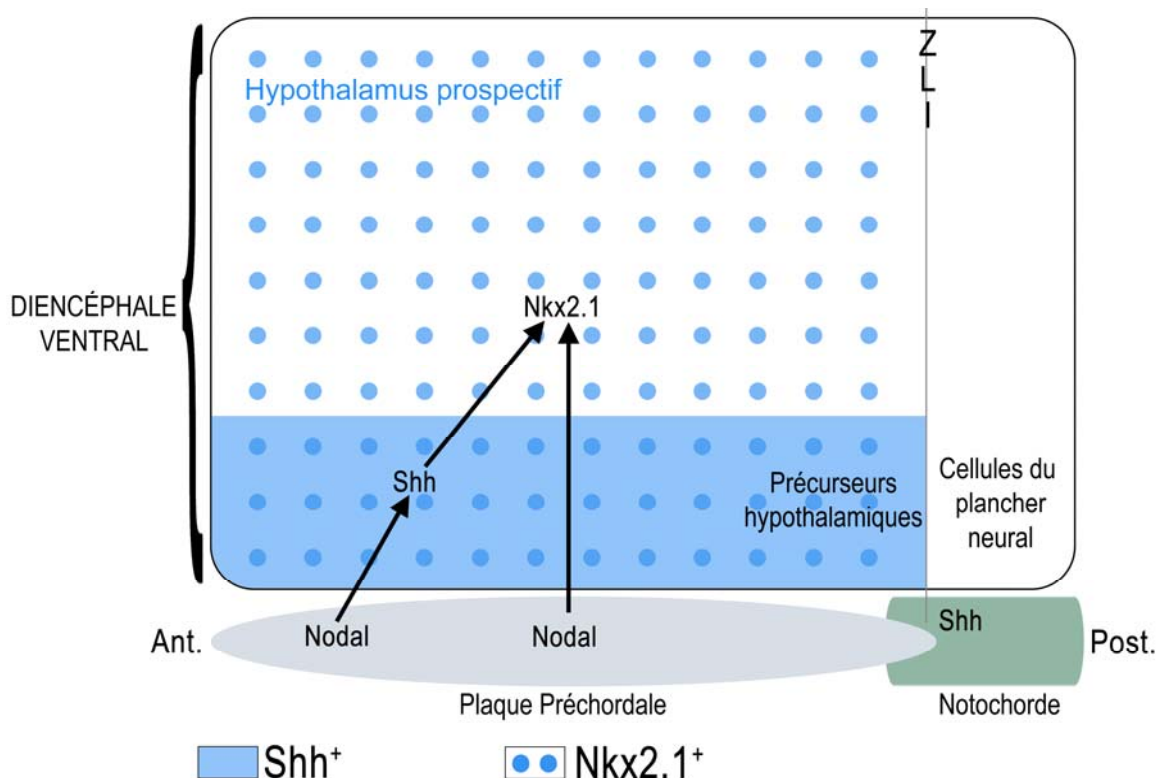


Figure 5. NODAL est essentiel à l'expression de *Nkx2.1* dans le diencéphale ventral et passerait par l'action de *Shh*. Noter que les flèches démontrent l'action des voies de signalisation, mais ne reflètent pas forcément une interaction moléculaire directe. ZLI : *Zona Limitans Intrathalamica*.

En plus de son rôle dans l'induction du devenir hypothalamique, NODAL serait aussi requis pour la migration postéro-antérieure des précurseurs hypothalamiques. En effet, les précurseurs hypothalamiques d'embryons mutants pour *Cyclop* n'effectuent pas cette migration (Varga, Z. M. et al. 1999). Le modèle proposé par Rohr et al est que la signalisation par NODAL induirait dans un premier temps le mouvement des précurseurs hypothalamiques vers leur destination finale où ces précurseurs seraient de nouveau soumis à l'action de NODAL puis à celle de SHH qui permettraient leur différenciation en cellules hypothalamiques (Rohr, K. B. et al. 2001). Toutefois, l'implication de NODAL dans la migration postéro-antérieure des précurseurs hypothalamiques a été remise en question par l'étude de Mathieu et al. En effet, ce groupe a démontré par une approche élégante d'embryons de poisson-zèbre chimériques,

où des embryons de type sauvage ont été transplantées avec des cellules mutantes pour *Oep* un médiateur de NODAL, que ces cellules migraient vers leur position antérieure malgré leur incapacité à recevoir les signaux de NODAL (Mathieu, J. et al. 2002). NODAL ne serait donc peut être pas requis pour induire cette migration mais serait toutefois essentiel à l'induction du devenir hypothalamique.

2.3 L'acquisition du devenir hypothalamique nécessite l'inhibition de la voie de signalisation des WNTs.

La famille des WNTs, composée de 19 gènes encodant des glycoprotéines sécrétées, est largement impliquée dans la régionalisation antéro-postérieure précoce de la plaque neurale grâce à un gradient d'activité faible rostralement et élevé caudalement (Kapsimali, M. et al. 2004; Yamaguchi, T. P. 2001). Les principaux effecteurs de cette voie de signalisation sont présentés à la figure 6. De plus, la perturbation du gradient d'activité des WNTs peut engendrer une perte des tissus antérieurs ou postérieurs du SNC selon les effecteurs affectés (Kim, C. H. et al. 2000; Popperl, H. et al. 1997).

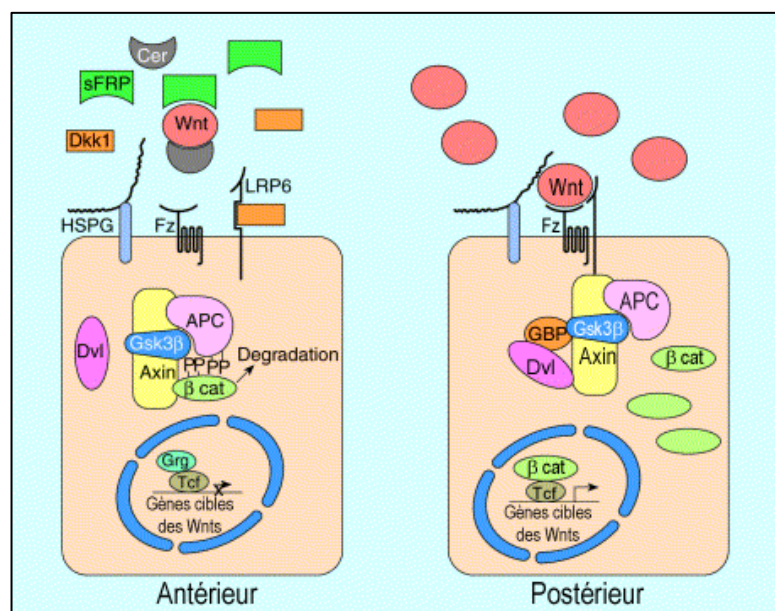


Figure 6. Principaux médiateurs de la voie de signalisation des WNTs. Dans la région antérieure de la plaque neurale, cette voie de signalisation est inhibée par l'action de plusieurs protéines contribuant à la dégradation de la β -Caténine, le principal effecteur des WNTs. A l'inverse, dans la région postérieure de la plaque neurale, cette voie de signalisation est fortement active et permet la transcription de gènes cibles. *Tirée et adaptée de Yamaguchi, T. P. 2001.*

Les embryons de poisson-zèbre *masterblind (mbl)* qui possèdent une mutation du gène *Axin1*, un effecteur négatif des WNTs qui participe à la dégradation de la β -caténine, présentent une régionalisation anormale du prosencéphale sans cyclopie (Heisenberg, C. P. et al. 2001; Kapsimali, M. et al. 2004). Toutefois, ces embryons voient leur domaine d'expression de *Nkx2.1* réduit de moitié au dépend de marqueurs rostraux – *Foxa1* et *Foxa2* – qui caractérisent normalement les cellules du plancher neural. Il semble donc que l'absence d'activité de l'*Axin1* chez ces embryons, provoquant inévitablement une augmentation de l'activité des WNTs dans la partie antérieure des cellules de la LMV, cause une expansion du développement des cellules du plancher neural au dépend des cellules hypothalamiques (Kapsimali, M. et al. 2004). Par ailleurs, la greffe de cellules exprimant l'*Axin1* chez les embryons *mbl* permet de restaurer l'expression postérieure de *Nkx2.1* et si cette greffe est réalisée au sein des cellules du plancher neural, elle permet l'expression ectopique de *Nkx2.1* au sein de ces cellules. L'action de l'*Axin1* favorise donc l'expression des marqueurs hypothalamiques au sein des cellules de la LMV. De plus, cette action semble être intrinsèque à ces cellules, puisque la surexpression d'antagonistes sécrétés des WNTs tels que DKK1, pouvant provenir par exemple du mésendoderme axial, ne permet pas l'expression ectopique de *Nkx2.1* (Kapsimali, M. et al. 2004). L'action de l'*Axin1*, inhibant l'activité des WNTs, au sein même des cellules de la LMV semble donc être essentielle à l'acquisition du devenir hypothalamique (Fig. 7).

De manière similaire, les souris homozygotes pour un allèle inactivé de *Six3*, un facteur de transcription normalement exprimé dans la partie antérieure de la plaque neurale (Oliver, G. et al. 1995), présentent des malformations des structures antérieures

de la tête incluant une perte d'expression des marqueurs de l'hypothalamus prospectif tel que *Nkx2.1* et *Shh* au dépend d'une expansion du domaine d'expression de *Wnt1* vers l'antérieur (Lagutin, O. V. et al. 2003). Lagutin et al ont permis de démontrer que le rôle de *Six3* au cours du développement du prosencéphale antérieur est principalement d'inhiber l'expression de *Wnt1* en se liant directement sur son promoteur. De plus, l'action de *Six3* sur l'expression de *Wnt1* semble être conservée au sein des vertébrés (souris, poisson-zèbre, poulet) (Lagutin, O. V. et al. 2003). L'établissement d'un environnement sans WNT grâce à l'action de *Six3* et d'inhibiteur des WNTs, tel que l'*Axin1*, serait donc un prérequis à l'expansion et à la maturation du prosencéphale antérieur (Fig. 7).

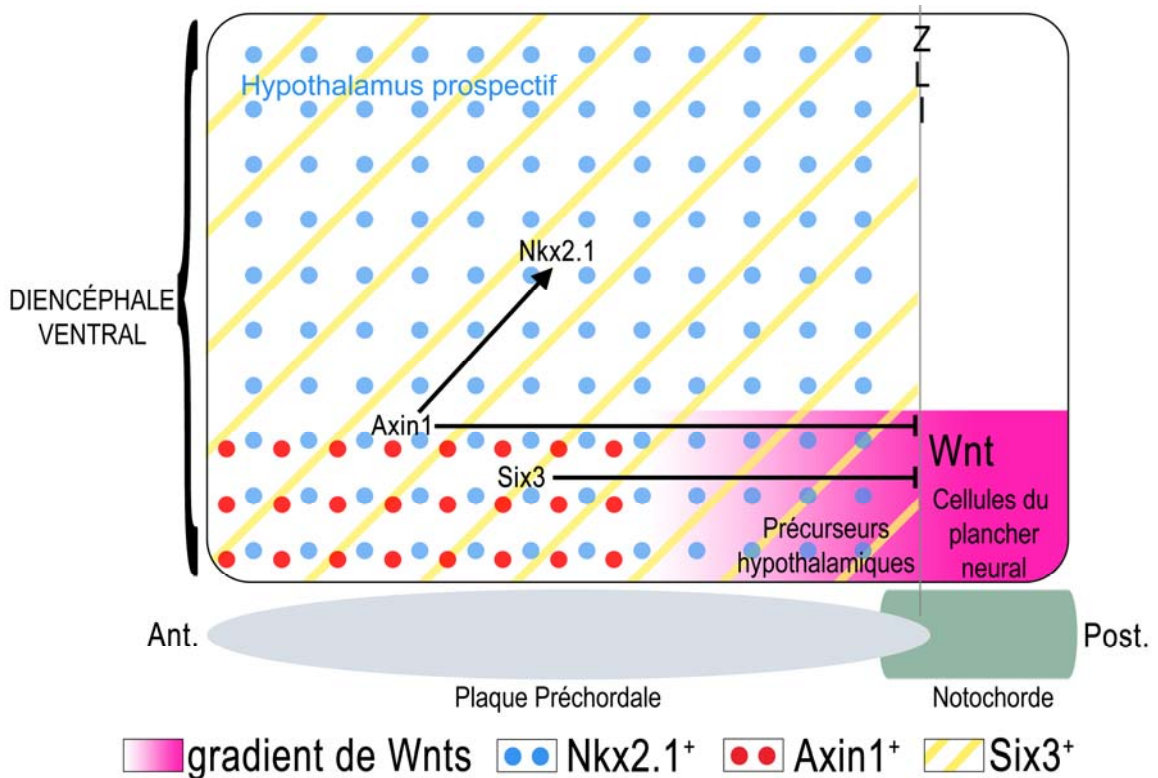


Figure 7. Le gradient de signalisation antéro-postérieur des WNTs, faible en antérieur et élevé en postérieur, permettrait d'établir la division entre les précurseurs hypothalamiques et les cellules du plancher neural. L'*Axin 1* et *Six3* permettraient de réduire l'expression des WNTs dans la partie antérieure du diencéphale ventral. Noter

que les flèches démontrent l'action des effecteurs de la voie de signalisation, mais ne reflètent pas forcément une interaction moléculaire directe.

2.4 Intégration des différentes voies de signalisation dans le développement précoce de l'hypothalamus.

On ne peut dissocier, l'une de l'autre, l'action des différentes voies de signalisation présentées ci-haut. En effet, l'ensemble de ces voies de signalisation semble coopérer pour permettre le développement d'un hypothalamus mature. Par exemple, la perte de capacité des cellules de la LMV à répondre aux voies de signalisation de SHH et NODAL empêche ces dernières de se différencier en précurseurs hypothalamiques. Par ailleurs, puisque la perte de réponse à une seule de ces deux voies de signalisation ne conduit pas à un phénotype aussi sévère chez le poisson-zèbre, il est fort probable que la coopération entre ces deux voies de signalisation soit nécessaire pour permettre le développement de l'hypothalamus (Mathieu, J. et al. 2002).

Également, l'*Axin1*, qui permet d'établir un gradient de WNTs au cours du développement hypothalamique, semble aussi promouvoir l'expansion latérale de l'expression de *Shh* en plus de faciliter l'action de NODAL (Kapsimali, M. et al. 2004). L'*Axin1* modulerait donc la réponse des cellules de la LMV aux signaux ventralisant émis par la PPC, que sont SHH et NODAL, en plus d'agir sur la fonction des WNTs (Kapsimali, M. et al. 2004). L'*Axin1* semble donc être un pivot central dans l'intégration des divers signaux impliqués dans l'acquisition du devenir hypothalamique.

2.5 Développement tardif de l'hypothalamus prospectif: régionalisation antéro-postérieure et dorsoventrale au sein de cette structure.

Suite à la spécification des précurseurs hypothalamiques mais juste avant l'apparition des premiers neurones différenciés, les voies de signalisation de WNT, BMP, SHH et NODAL jouent de nouveau un rôle dans la régionalisation antéro-postérieure et dorso-ventrale de l'hypothalamus.

2.5.1 Spécification de l'hypothalamus postérieur : rôle de WNT.

L'inhibition de la voie de signalisation des WNTs dans la partie antérieure de la plaque neurale est nécessaire pour établir la frontière entre les précurseurs hypothalamiques et les cellules du plancher neural impliquées dans l'induction des structures plus postérieures du cerveau. Toutefois, l'action des WNTs semble être également essentielle, dans un deuxième temps, au sein de l'hypothalamus pour promouvoir la régionalisation antéro-postérieure de cette structure. Par exemple, les embryons de poisson-zèbre *mbl*, chez qui le développement de l'hypothalamus est perturbé, retiennent quand même un sous-domaine hypothalamique caractérisé par l'expression d'*Emx2*, un marqueur de l'hypothalamus postérieur et par l'absence d'expression de *Rx3*, un marqueur de l'hypothalamus antérieur. Il semble donc que l'action de l'*Axin1* soit uniquement requise pour le développement de l'hypothalamus antérieur comme démontré par la récupération de l'expression de *Rx3* chez les embryons *mbl* transplantés avec des cellules exprimant l'*Axin1* (Kapsimali, M. et al. 2004). Par ailleurs, l'expression de *Wnt* serait requise pour le développement de la partie postérieure de l'hypothalamus (Kapsimali, M. et al. 2004). De manière similaire, les souris mutantes pour *Six3* retiennent l'expression de *Nkx2.1* et de *Shh* uniquement dans ce qui correspond à l'hypothalamus postérieur (Lagutin, O. V. et al. 2003). La voie de signalisation des WNTs a donc, premièrement, une action sur la subdivision des cellules de la LMV en cellules hypothalamiques et en cellules du plancher neural et deuxièmement sur la régionalisation interne de l'hypothalamus favorisant le devenir postérieur des cellules qui peuplent cette structure du cerveau.

Plus spécifiquement, des études réalisées chez le poisson-zèbre ont démontré qu'une cascade de signalisation impliquant *Wnt8b* est requise pour la neurogenèse d'une population neuronale spécifique de l'hypothalamus postérieur (Lee, J. E. et al. 2006). WNTs8b régule, via le facteur de transcription *Lef1*, la transcription de *Sox3* qui serait requise pour initier la neurogenèse, soit la sortie du cycle cellulaire et la différenciation neuronale des cellules de l'hypothalamus postérieur (Fig. 8). En effet, l'élimination de la fonction de *Wnt8b* ou *Lef1* par l'injection de morpholinos chez le

poisson-zèbre provoque une perte d'expression des marqueurs proneuraux et neuronaux de l'hypothalamus postérieur sans toutefois affecter la prolifération cellulaire (Lee, J. E. et al. 2006). Par ailleurs, les profils d'expression de *Wnt8b* (Lako, M. et al. 1998) et *Lef1* (Galceran, J. et al. 2000) sont conservés chez les mammifères. Également, la fonction de *Sox3* (Rizzoti, K. et al. 2004; Solomon, N. M. et al. 2004; Woods, K. S. et al. 2005) est aussi conservée chez les mammifères et semble être également associée à la neurogenèse de l'hypothalamus postérieur ainsi qu'au bon fonctionnement du système endocrinien.

2.5.2 Spécification de l'hypothalamus antéro-dorsal : rôle de SHH.

Dans les stades précoces du développement, *Shh* est exprimé dans l'ensemble de l'hypothalamus prospectif défini par le profil d'expression de *Nkx2.1* (Rohr, K. B. et al. 2001). Toutefois, au cours du temps l'expression de *Shh* tend à diminuer au sein de l'hypothalamus postéro-ventral pour ne persister que dans ce qui correspond à l'hypothalamus antéro-dorsal (Barth, K. A. and Wilson, S. W. 1995). Ce domaine d'expression antéro-dorsal de *Shh* semble donner naissance à des neurones contribuant aux noyaux de la région supraoptique de l'hypothalamus aussi nommé hypothalamus antérieur (Fig. 1, Puelles, L. 1995). En effet, les embryons de poisson-zèbre *Smu* (*slow-muscle-omitted*), un mutant de la voie de signalisation de *Shh*, présentent une expansion du domaine d'expression d'*Emx2* dans ce qui correspondrait au domaine antéro-dorsal d'expression de *Shh*. A l'inverse, la surexpression de *Shh* chez des embryons de poisson-zèbre de type sauvage provoque l'absence d'expression d'*Emx2* au profit de marqueurs de l'hypothalamus antérieur (Mathieu, J. et al. 2002). *Shh* doit donc limiter l'expansion de l'hypothalamus postéro-ventral pour permettre le développement antérieur de cette région à un stade plus tardif du développement (Fig. 8).

2.5.3 Spécification de l'hypothalamus postéro-latéral : rôle de SHH et BMP7.

L'hypothalamus postéro-latéral est occupé par des neurones dopaminergiques caractérisables au cours de leur différenciation par la coexpression transitoire de *Shh* et *Nkx2.1* puis de *Nkx2.1/Msx* et de la tyrosine hydroxylase, un marqueur typique des

neurones dopaminergiques. Des expériences d'explants d'hypothalamus et de PPC ont permis de démontrer que l'induction de ces neurones est dépendante de leur position par rapport à la PPC (les cellules à proximité de la PPC tendent à se différencier en cellules tubéro-ventrales alors que les cellules plus éloignées deviennent des neurones dopaminergiques), laissant penser qu'un gradient de signalisation affecte différemment ces neurones (Ohyama, K. et al. 2005). Plus spécifiquement, l'exposition d'explants d'hypothalamus à des sources de SHH et/ou BMP7 a permis de mettre en évidence que la différenciation de ces neurones passent d'abord par l'action de *Shh*, qui ventralise les précurseurs, puis par l'induction, via BMP7, de caractéristiques propres aux neurones dopaminergiques de l'hypothalamus. La différenciation de ces neurones *in vivo* et *in vitro* corrèle également avec l'expression de *Six3* et requiert la fonction de ce facteur de transcription (Ohyama, K. et al. 2005). En résumé, l'action combinée mais séquentielle de SHH et BMP7 permet d'induire la différenciation des progéniteurs hypothalamiques en neurones dopaminergiques hypothalamiques dans un domaine de compétence où est exprimé *Six3*. Au sein de ce domaine, *Six3* réprime *Wnt1* (Lagutin, O. V. et al. 2003) et la diminution de l'activité des WNTs dans cette région de l'hypothalamus semble être propice à la différenciation de ces neurones (Fig. 8).

2.5.4 Spécification de l'hypothalamus postéro-ventral : rôle de NODAL et de BMP7.

Chez le poisson-zèbre, certains mutants pour la voie de signalisation de NODAL présentent des phénotypes moins sévères où seule la partie postérieure de l'hypothalamus est absente, laissant penser que le développement de cette région de l'hypothalamus est plus sensible à la réduction de la signalisation par NODAL (Mathieu, J. et al. 2002). A la différence des cellules qui peuplent l'hypothalamus antérieur, les cellules de l'hypothalamus postérieur semblent nécessiter une action directe de la voie de signalisation de NODAL pour permettre leur différenciation. En effet, les cellules incapables de répondre au signal de NODAL n'expriment pas *Emx2* et sont exclues de l'hypothalamus postéro-ventral au profit de l'hypothalamus antéro-dorsal (Mathieu, J. et al. 2002).

Au cours de la régionalisation de l'hypothalamus, le niveau d'expression de *Shh* diminue au niveau de l'hypothalamus postéro-ventral et cette diminution d'expression est nécessaire à la différenciation des cellules qui peuplent cette région. L'équipe de Manning et al a permis de démontrer que la diminution d'expression de *Shh* dans cette région est dépendante des BMPs. Plus spécifiquement, BMP7, qui est exprimé au sein de l'hypothalamus postéro-ventral, initierait une cascade de signalisation qui inhiberait localement l'action des WNTs ce qui favoriserait l'expression du facteur de transcription *Tbx2*. A son tour, *Tbx2* inhiberait *Shh*, permettant ainsi l'expression d'*Emx2* (Manning, L. et al. 2006). Par ailleurs, la diminution d'expression de *Shh* serait aussi essentielle pour permettre la prolifération cellulaire au sein de cette région de l'hypothalamus (Manning, L. et al. 2006). On fait donc face ici à un modèle où la régionalisation de l'hypothalamus postéro-ventral serait dépendante, premièrement de l'action de NODAL et des WNTs pour spécifier le caractère postérieur de cette région, puis deuxièmement de l'action des BMPs qui dérivent de la PPC et qui antagoniseraient l'action des WNTs permettant ainsi la différenciation cellulaire au sein de cette région.

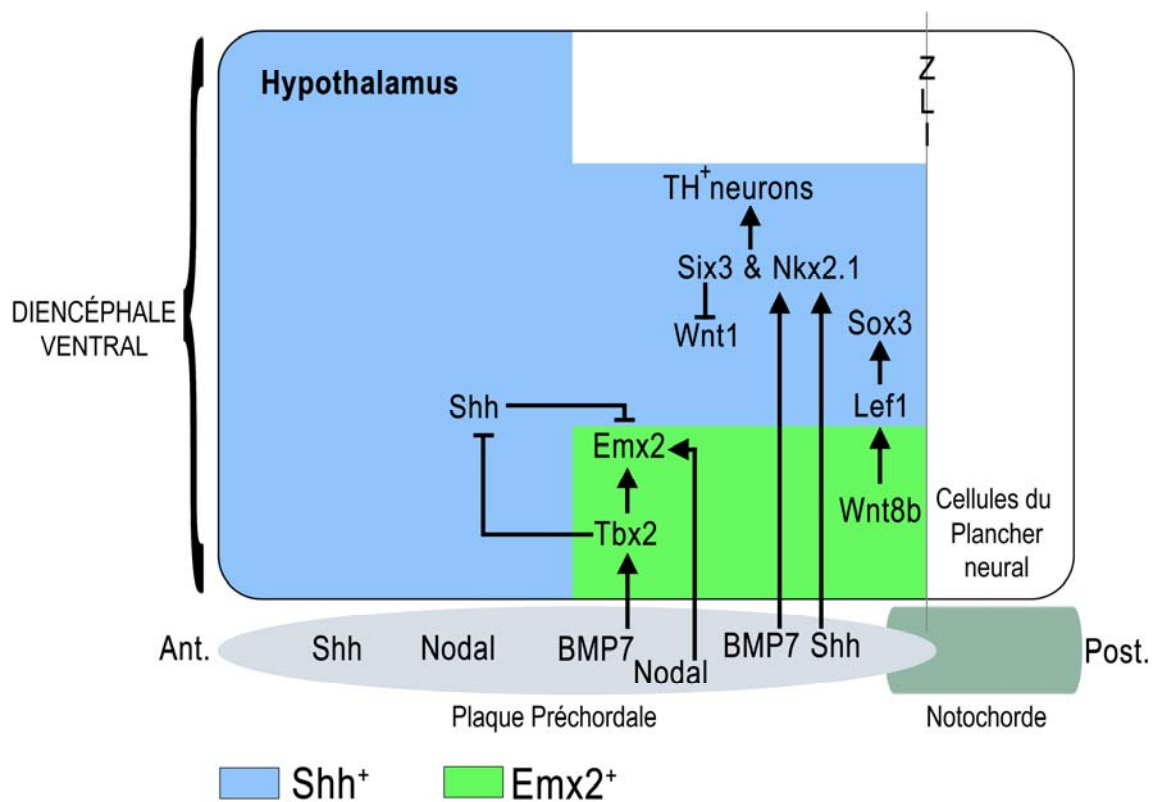


Figure 8. Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régionalisation antéro-postérieure et dorso-ventrale de l'hypothalamus. L'intégration de l'ensemble de ces voies est nécessaire à l'obtention d'un hypothalamus mature. Noter que les flèches démontrent l'action des effecteurs des voies de signalisation, mais ne reflètent pas forcément une interaction moléculaire directe. *Shh* est nécessaire à la spécification de l'hypothalamus antérieur. A l'inverse, l'action des WNTs permet la spécification de l'hypothalamus postérieur. De plus, au sein de l'hypothalamus postérieur, l'action combinée de SHH, BMP7 et *Six3* est nécessaire à l'induction des neurones dopaminergiques alors que BMP7 et NODAL seraient requis pour la ventralisation de cette même région.

2.6 La neurogenèse au cours du développement de l'hypothalamus.

Au sein du SNC, le phénomène de neurogenèse a été largement décrit (revu dans Markakis, E. A. 2002). De manière générale, les neurones sont générés dans la zone ventriculaire, immédiatement adjacente à la lumière du tube neural, puis migrent selon deux mécanismes possibles pour atteindre leur destination finale. Précisément, les neurones peuvent migrer radialement en quittant la zone ventriculaire pour se diriger en ligne droite vers la surface externe du SNC (zone du manteau) ou encore les neurones peuvent, après être sortis de la zone ventriculaire, quitter les fibres radiales et migrer tangentiellement à la surface du SNC.

Les études classiques de datation (*birthdating studies*) réalisées par l'injection de thymidine radioactive ou de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) chez des rates gestantes ont permis d'établir que la plupart des neurones hypothalamiques naissent au 13ème et au 15ème jour embryonnaire (Ifft, J. D. 1972). Ce travail a aussi mis en évidence que cette prolifération cellulaire s'effectue selon un gradient où les premiers neurones émergeant forment les structures latérales de l'hypothalamus alors que les neurones naissant plus tardivement composent les noyaux médians de l'hypothalamus (Altman, J. and Bayer, S. A. 1986; Ifft, J. D. 1972; Markakis, E. A. 2002). De manière similaire, des études réalisées chez les primates non humains décrivent également cette progression

latéro-médiale dans la génération des cellules hypothalamiques (van Eerdenburg, F. J. and Rakic, P. 1994). Ces études suggèrent que la plupart des noyaux hypothalamiques sont formés aux abords de la zone ventriculaire et sont déplacés radialement vers la surface de l'hypothalamus du à l'apparition de nouveaux neurones. Cette migration neuronale s'effectue le long de cellules spécialisées appelées cellules gliales radiales. Ces cellules s'étendent de la zone ventriculaire à la surface du cerveau et servent de support pour guider les neurones au cours de leur migration.

Une approche élégante employant l'injection, au niveau du diencephale ventral de l'embryon de poulet, de rétrovirus incapables de se répliquer et pouvant marqués individuellement chaque progéniteur et sa descendance a démontré que dans les étapes précoces de la neurogenèse la plupart des clones adopte un patron de migration radiale (Arnold-Aldea, S. A. and Cepko, C. L. 1996). Ce mécanisme de migration semble être général et permettre la formation de la zone du manteau. Toutefois, plus tard au cours du développement il y a augmentation de la dispersion des clones selon un patron très différent. Ce phénomène de migration tangentielle semble se réaliser de trois manières (Fig. 9). Premièrement, la majorité des neurones adopte un patron de migration radiale à la sortie de la zone ventriculaire. Plus tard au cours du développement, ces neurones peuvent se disperser pour aller peupler différentes régions hypothalamiques. Deuxièmement, les progéniteurs au sein de la zone ventriculaire semblent pouvoir migrer au sein de cette région, créant ainsi leur dispersion et adoptant un patron de migration radiale à leur sortie de cette zone (Arnold-Aldea, S. A. and Cepko, C. L. 1996). Troisièmement, à la sortie de la zone ventriculaire les neurones adoptent un patron de migration tangentielle qui leur permet d'aller peupler différentes régions de l'hypothalamus (Arnold-Aldea, S. A. and Cepko, C. L. 1996). Ce dernier mode de migration est adopté seulement par une faible proportion des neurones hypothalamiques. Chacun de ces phénomènes de migration joue probablement un rôle distinct essentiel à la morphogenèse de l'hypothalamus.

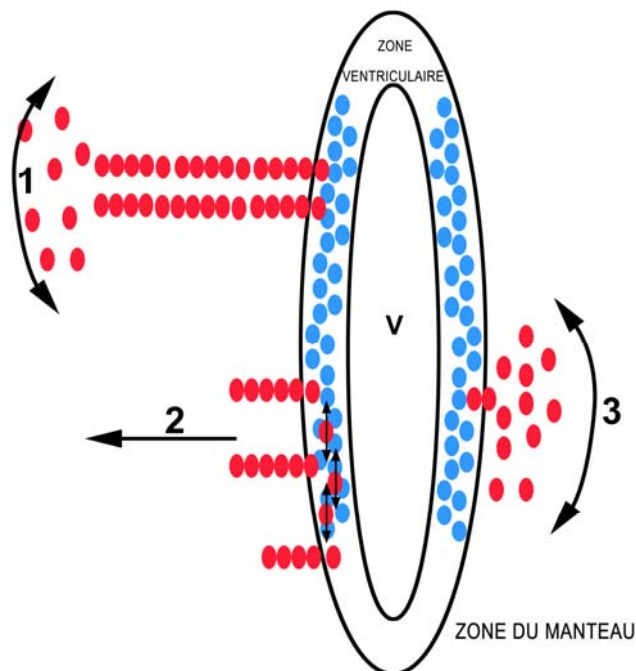


Figure 9. Plusieurs mécanismes de migration radiale et tangentielle ont lieu au cours de la neurogenèse de l'hypothalamus. 1) La majorité des neurones de l'hypothalamus migrent radialement à leur sortie de la zone ventriculaire. Plus tard au cours du développement, ces neurones peuvent se disperser dans la zone du manteau. 2) Précocement au cours du développement, les progéniteurs peuvent migrer pour se disperser au sein de la zone ventriculaire et les neurones, qui en découlent, adoptent un patron de migration radiale lorsqu'ils gagnent la zone du manteau. 3) A la sortie de la zone ventriculaire, une minorité de neurones adopte un patron de migration tangentielle et se disperse parallèlement à la surface de l'hypothalamus. V : ventricule. *Adaptée de Arnold-Aldea, S. A. and Cepko, C. L. 1996).*

3. Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus

L'hypothalamus antérieur est composé d'une demi-douzaine de noyaux auxquels des fonctions physiologiques bien définies ont été assignées. Au cours des années, une attention particulière a été portée au noyau paraventriculaire (PVN) qui joue un rôle clé dans la régulation de la sécrétion hormonale hypophysaire.

3.1 Composition cellulaire et fonctions du PVN

Le PVN est composé de deux populations neuronales majeures, soient les neurones magnocellulaires et parvocellulaires, qui participent au contrôle d'une série de phénomènes physiologiques d'une part via des projections à l'hypophyse et d'autre part via des projections au système nerveux autonome (SNA) (Fig. 10). Les neurones magnocellulaires projettent leurs axones à l'hypophyse postérieure où ils sécrètent l'ocytocine (OT) et l'arginine vasopressine (AVP) directement dans la circulation sanguine (Swanson, L. W. and Sawchenko, P. E. 1983). L'OT est impliquée dans les phénomènes de lactation et de contractions utérines, l'AVP est quant à elle requise pour la régulation de la pression artérielle, du volume sanguin et de l'osmolalité. Ces neurones magnocellulaires composent en totalité le noyau supraoptique (SON) qui dérive du PVN au cours du développement. Les neurones parvocellulaires du PVN et du noyau périventriculaire antérieur (aPV), noyau situé ventralement au PVN, projettent leurs axones à l'éminence médiane où ils sécrètent, respectivement, les facteurs de libération de la corticotropine (CRH) et de la thyrotropine (TRH) ainsi que la somatostatine (SS). Ces trois neuropeptides sont ensuite transportés, via la veine porte, vers l'hypophyse antérieure où ils régulent la sécrétion de l'adrénocorticotropine (ACTH), de la thyrotropine (TSH), de l'hormone de croissance et des gonadotropines. En résumé, AVP, OT, TRH, CRH et SS modulent la sécrétion des hormones hypophysaires et sont considérés comme étant des marqueurs de la différenciation terminale du PVN. Ils définissent ainsi au moins cinq types cellulaires distincts au sein du PVN. Par ailleurs, un autre groupe de neurones parvocellulaires exprimant l'OT, l'AVP et la CRH, présent au sein du PVN, projette ses axones au niveau du tronc cérébral où ils agissent sur le SNA permettant, entre autre, la régulation de l'appétit (Swanson, L. W. and Sawchenko, P. E. 1983).

Les précurseurs des neurones parvocellulaires et magnocellulaires naissent entre le dixième (E10,5) et le douzième (E12,5) jour embryonnaire chez la souris au niveau de la région paraventriculaire. Les cellules qui forment le PVN restent proches de la région ventriculaire, alors que les cellules qui forment le SON migrent plus latéralement pour atteindre la surface de l'hypothalamus (Altman, J. and Bayer, S. A. 1978). A partir du

douzième jour embryonnaire jusqu'à la veille de la naissance de la souris, ces neurones se différencient de manière terminale donnant progressivement naissance aux cellules synthétisant la TRH, l'AVP, l'OT, la SS et la CRH (Swanson, L. W. and Sawchenko, P. E. 1983).

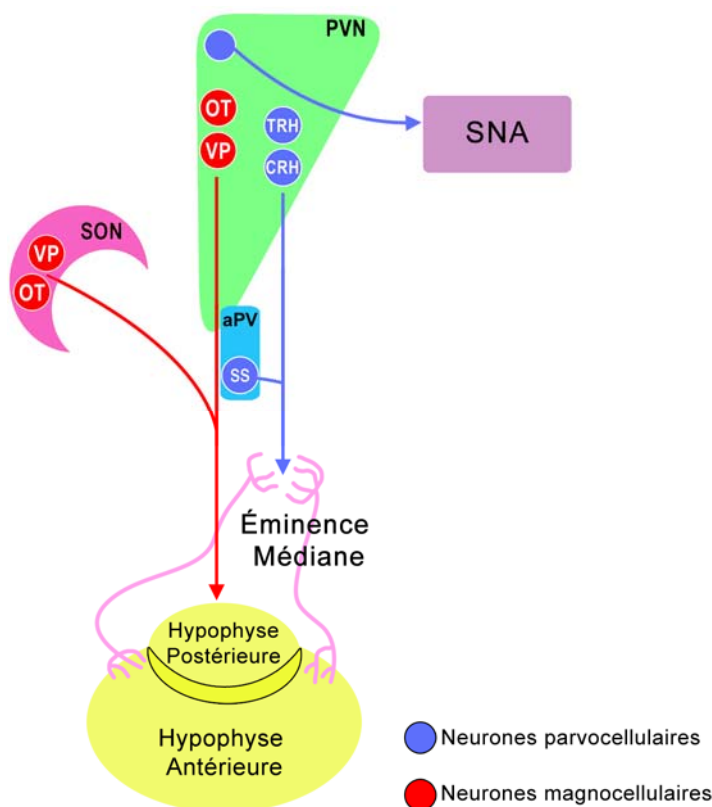


Figure 10. Le PVN, ses types cellulaires et ses projections axonales. Le PVN est composé de deux populations neuronales majeures, les neurones magnocellulaires et parvocellulaires, qui projettent leurs axones à l'hypophyse et au système nerveux autonome (SNA). SON : noyau supraoptique, aPV : noyau périventriculaire antérieur.

4. Développement du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus.

Mis à part, le développement précoce et la régionalisation antéro-postérieure et dorso-ventrale de l'hypothalamus, peu de choses sont connues sur la différenciation des neurones peuplant les différents noyaux hypothalamiques. Toutefois, récemment une

cascade de facteurs de transcription a été identifiée comme jouant un rôle capital dans le développement des lignées neuroendocriniennes qui composent le PVN.

4.1 Cascade de facteurs de transcription contrôlant le développement du PVN.

Des études de pertes de fonction ont démontré l'implication de plusieurs facteurs de transcription dans l'émergence des différents types cellulaires qui peuplent le PVN. Le facteur de transcription SIM1, caractérisé par des domaines bHLH-PAS, ainsi que son partenaire de dimérisation ARNT2 sont requis pour le développement des lignées cellulaires exprimant l'AVP, l'OT, la SS, la TRH et la CRH (Michaud, J. L. et al. 1998). Chez des embryons muridés homozygotes pour un allèle nul de *Sim1* ou d'*Arnt2*, les neurones du PVN et du SON sont générés, comme attendu entre E10,5 et E12,5, mais ne complètent pas leur différenciation terminale (Michaud, J. L. et al. 1998). Au 14-15ème jour de gestation, ces neurones ou bien meurent ou bien changent d'identité (Michaud, J. L. et al. 1998). De manière similaire, il y a absence de différenciation terminale des neurones du PVN et du SON chez les souris homozygotes pour un allèle nul d'*Otp*. OTP est un facteur de transcription caractérisé par un homéodomaine. Il est requis pour la prolifération, la migration et la différenciation des neurones du PVN, ceci en agissant parallèlement à *Sim1* (Acampora, D. et al. 1999).

Également, SIM1 :ARNT2 et OTP sont tous trois responsables du maintien de l'expression régionalisée de deux autres facteurs de transcription impliqués à leur tour dans la différenciation de types cellulaires distincts. Les souris mutantes pour le facteur de transcription BRN2, facteur caractérisé par un domaine POU, ont un phénotype qui ressemble partiellement à ceux des souris mutantes pour *Sim1* et *Otp*. En effet, le PVN de ces souris ne contient aucune cellule OT, AVP et CRH (Nakai, S. et al. 1995; Schonemann, M. D. et al. 1995). Les études de perte de fonction pour *Sim1* et *Otp* ont permis de démontrer que BRN2 agissait sur la même voie génétique que ces deux facteurs de transcription (Acampora, D. et al. 1999; Michaud, J. L. et al. 1998). En fait, BRN2 agit en aval de SIM1 et OTP ce qui explique le phénotype partiel retrouvé chez le mutant *Brn2* où les cellules TRH et SS sont toujours présentes. De plus, le facteur de transcription BRN2 est exprimé dans plusieurs régions du cerveau. Toutefois, son

expression est régulée par SIM1 et OTP que dans les parties les plus médiane et postérieure du PVN. Le deuxième facteur de transcription régulé par SIM1 et OTP est *Sim2*, un paralogue de *Sim1*. SIM2 est exprimé dans le noyau périventriculaire antérieur et dans la partie la plus antérieure du PVN. Il régule la différenciation de plus de 80% des cellules exprimant la SS et d'environ 50% des cellules exprimant la TRH (Goshu, E. et al. 2004). Le fait que toutes les cellules TRH et SS ne soient pas affectées par la perte de *Sim2* semble être expliqué par un phénomène de compensation. En effet, si on supprime un allèle *Sim1* chez une souris déjà mutante pour *Sim2*, il y a aggravation du phénotype jusqu'à la perte totale de toutes les cellules TRH et SS lors de la suppression des deux allèles *Sim1* chez cette même souris. Il s'avère en fait d'une part que *Sim1* agit en amont de *Sim2* et que d'autre part il est capable de compenser de manière partielle pour la perte d'expression de *Sim2* (Goshu, E. et al. 2004). Toutefois, l'emplacement exact de ces deux gènes (*Sim2* et *Brn2*), dans le programme génétique contrôlé par *Sim1* et *Otp*, est inconnu. De même, la manière dont ils sont régulés, directement ou indirectement par *Sim1* et *Otp*, est également indéfinie.

Otp est non seulement requis pour la prolifération et la survie des progéniteurs du PVN et du SON mais est aussi requis pour leur migration adéquate. En effet, chez les souris *Otp*^{-/-}, où le gène rapporteur *LacZ* a été introduit par recombinaison homologue sous le contrôle du promoteur d'*Otp*, les cellules positives pour le *LacZ* présentent un patron de migration anormale. Au lieu, de se retrouver au sein du PVN ou de migrer vers le SON (à la surface de l'hypothalamus) ces cellules sont coincées dans une position intermédiaire entre ces deux noyaux (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). Récemment, des expériences similaires ont été réalisées avec les souris *Sim1*^{-/-}. De manière intéressante, un patron de migration anormale a aussi été montré chez ces souris même s'il n'est pas tout à fait similaire à celui des souris *Otp*^{-/-} (Xu, C. and Fan, C. M. 2007). L'étude des profils d'expression de gènes candidats impliqués dans la migration neuronale, tels que les *neuropilines* et les *plexines*, a révélé que deux gènes soient les *plexines A1* et *C1* voient leur profil d'expression perturbé chez les souris *Sim1*^{-/-}. Plus spécifiquement, il semble que la *PlexinC1* soit régulée positivement par *Sim1* ou par un de ses effecteurs. Chez les souris homozygotes pour un allèle nul de *PlexinC1*, les

neurones OT et AVT ne migrent pas correctement vers le SON et se retrouvent éparpillés entre le PVN et le SON (Xu, C. and Fan, C. M. 2007). Le modèle proposé par Xu et Fan est que puisque la *PlexinC1*, exprimée par les neurones OT et AVP, est un récepteur potentiel, elle recevrait des signaux d'un ligand situé entre le PVN et le SON. Ce ligand serait une molécule sécrétée qui repousserait les neurones OT et AVP pour leur permettre d'atteindre leur destination finale soit le SON. Toutefois aucun ligand liant la *PlexinC1* n'a encore été identifié à ce jour. Quant à la *PlexinA1*, son expression serait inhibée directement ou indirectement par *Sim1* juste avant que les neurones du PVN et du SON commencent à se séparer pour former deux noyaux distincts (Fig. 11).

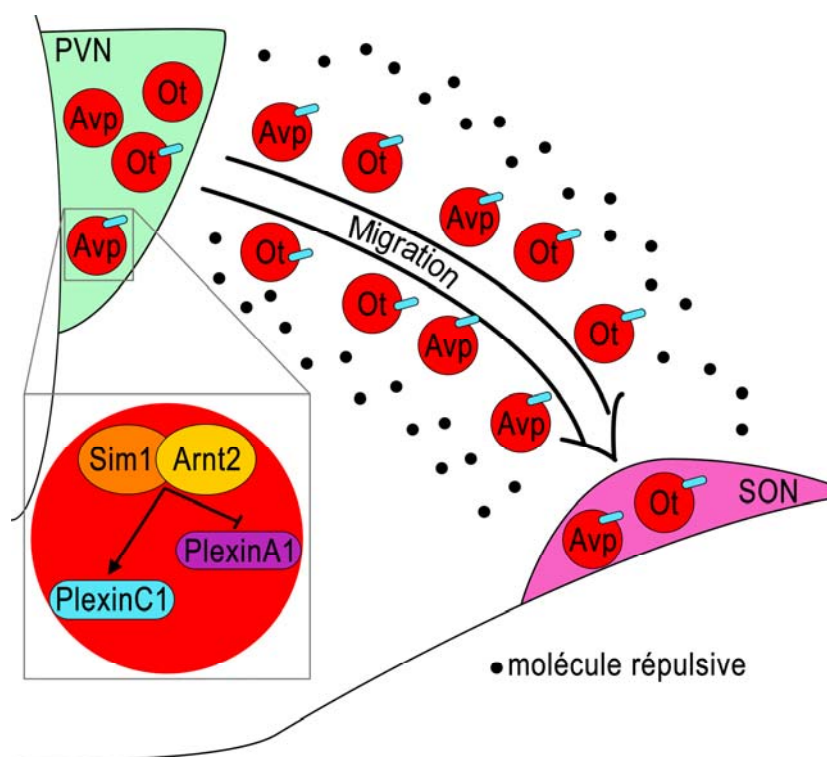


Figure 11. Modèle proposé par Xu, C. et Fan, C. M. 2007 pour la migration des neurones magnocellulaires vers le SON. Des signaux répulsifs situés de part et d'autre entre le PVN et le SON permettraient la migration des neurones magnocellulaires vers la surface externe de l'hypothalamus. Les neurones magnocellulaires expriment la *PlexinC1*, un récepteur essentiel à l'intégration des signaux répulsifs. L'expression de ce récepteur est dépendante du dimère SIM1 :ARNT2.

En résumé, la combinaison des domaines d'expression de ces cinq facteurs de transcription – *Sim1*, *Arnt2*, *Otp*, *Brn2* et *Sim2* – crée deux domaines distincts au sein du PVN : un domaine antérieur-latéral exprimant SIM1/ARNT2, OTP, SIM2 et composé de cellules TRH et SS ainsi qu'un domaine plus postérieur-médian exprimant SIM1/ARNT2, OTP, BRN2 et composé de cellules AVP, OT et CRH. Il s'avère donc que ces cinq facteurs de transcription font partie d'une cascade qui permet de définir progressivement le phénotype des divers types cellulaires présents au sein du PVN (Fig. 12).

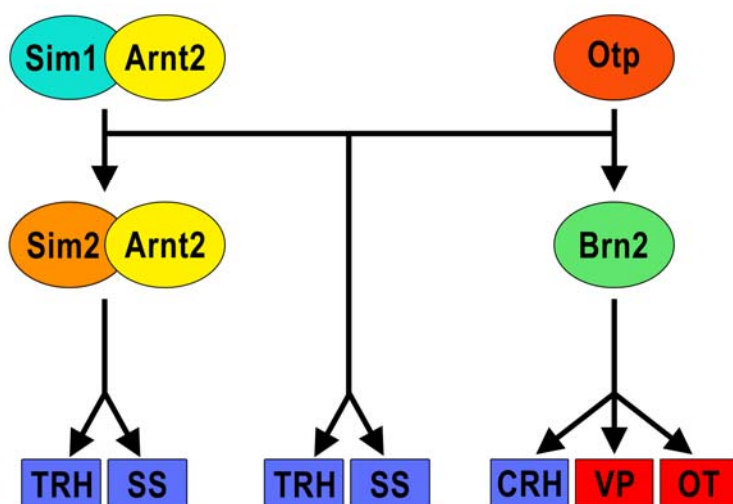


Figure 12. Cascade de facteurs de transcription régulant la différenciation des cinq types cellulaires majeurs qui peuplent le PVN. SIM1 et OTP agissent en parallèle à la tête de cette cascade pour maintenir l'expression de BRN2 et SIM2 qui sont quant à eux requis pour la différenciation terminale de types cellulaires distincts.

5. Les facteurs de transcription de la famille des bHLH-PAS.

Les protéines SIM1, SIM2 et ARNT2, qui sont essentielles au développement du PVN, font partie d'une famille de facteurs de transcription à domaine bHLH-PAS. Cette famille de protéines est impliquée dans le développement embryonnaire et dans la détection et l'adaptation aux changements environnementaux tels que la réponse à des environnements contaminés par des composés aromatiques (via la protéine AHR), l'adaptation à l'hypoxie (via HIF) ou encore le contrôle du rythme circadien (via la

protéine CLOCK) (Gu, Y. Z. et al. 2000). Ces protéines fonctionnent principalement sous forme d'hétérodimères composés d'un partenaire dont l'expression est dépendante d'un stimulus extérieur ou restreinte spatialement ou dans le temps tel que c'est le cas pour *Sim1*, *Sim2*, *Hif* et *Ahr* alors que l'autre partenaire, qui est requis pour l'activité transcriptionnelle, est exprimé de manière plus générale (Crews, S. T. et al. 1988; Crews, S. T. 1998). Seules 4 protéines, *Arnt*, *Arnt2*, *Bmal1* et *Bmal2*, ont été identifiées comme appartenant à la deuxième classe de partenaires (Hirose, K. et al. 1996; Hoffman, E. C. et al. 1991; Hogenesch, J. B. et al. 2000; Ikeda, M. et al. 2000; Takahata, S. et al. 1998).

Cette famille de protéines est caractérisée par une région de 250 à 300 acides aminés incluant une paire de domaines PAS nommés ainsi pour PER, ARNT, SIM : les 3 premiers gènes identifiés contenant ce domaine (Nambu, J. R. et al. 1996). Ces deux domaines PAS, PAS-A et PAS-B, sont composés d'une cinquantaine d'acides aminés hautement conservés (Crews, S. T. et al. 1988; Nambu, J. R. et al. 1996) et sont impliqués dans des interactions homo et hétérotypiques avec d'autres membres de la famille bHLH-PAS (Huang, Z. J. et al. 1993) ou avec des protéines chaperonnes (Perdew, G. H. 1988) ou d'autres protéines sans domaine PAS (Zelzer, E. and Shilo, B. Z. 2000). De plus, certaines protéines de la famille bHLH-PAS ont la capacité de lier, via leurs domaines PAS, de petites molécules telles que la dioxine, un composé aromatique (Burbach, K. M. et al. 1992; Dolwick, K. M. et al. 1993a; Dolwick, K. M. et al. 1993b). Par ailleurs, ceux sont les domaines PAS qui confieraient la spécificité de chaque protéine bHLH-PAS envers son partenaire de dimérisation et ses gènes cibles. En effet, une construction de la protéine *Ahr* contenant uniquement les domaines bHLH et PAS-A est capable d'interagir à la fois avec *Arnt2* et *Arnt*, l'ajout du domaine PAS-B de *Ahr* à cette construction limite *Ahr* à lier uniquement *Arnt* (Sekine, H. et al. 2006). De plus, la construction de protéines chimérique via l'échange des domaines PAS du facteur de transcription *Trachealess* par les domaines PAS du facteur de transcription *Single-minded* (*Sim*) est suffisant pour convertir *Trachealess* à induire l'expression des gènes cibles de *Sim* (Zelzer, E. et al. 1997). Immédiatement adjacent en N-Terminal des domaines PAS, ces protéines possèdent un domaine HLH qui est une interface de

dimérisation homotypique précédée par un domaine basique (b) qui permet la liaison de la protéine à son ADN cible (Murre, C. et al. 1994). Finalement, en C-terminal des domaines PAS se situe le domaine de régulation de la transcription qui peut avoir des fonctions activatrices ou répressives selon la protéine.

5.1 Fonctions transcriptionnelles de SIM1 et SIM2.

Les protéines SIM1 et SIM2 reconnaissent sur les promoteurs de leurs gènes cibles une séquence spécifique, G/ATACGTGA, nommée CME pour « *central midline enhancer* ». Cette séquence, identifiée chez la drosophile, est liée par SIM et permet à ce dernier d'augmenter la transcription de ses gènes cibles (Sonnenfeld, M. et al. 1997). Il a également été démontré dans un contexte cellulaire que SIM1 et SIM2 lient cette séquence (Moffett, P. and Pelletier, J. 2000). Toutefois, la liaison au CME par SIM1 ou SIM2 passe par leur dimérisation avec une protéine bHLH-PAS du deuxième groupe (ie : ARNT, ARNT2, BMAL1 et BMAL2). Des essais de système double-hybride chez la levure ainsi que des études biochimiques ont permis de démontrer que SIM1 est capable d'interagir avec ARNT, ARNT2 ou BMAL1 alors que SIM2 n'interagirait qu'avec ARNT ou ARNT2 (Ema, M. et al. 1996; Michaud, J. L. et al. 2000). Par ailleurs, l'étude des profils d'expression d'*Arnt*, *Arnt2* et *Bmal1* *in vivo* chez l'embryon de souris démontre que seul *Arnt2* est fortement coexprimé avec *Sim1* et *Sim2* au niveau de l'hypothalamus antérieur. De plus, les souris mutantes pour *Arnt2* montrent les mêmes défauts hypothalamiques que les souris mutantes pour un allèle nul de *Sim1* suggérant fortement qu'ARNT2 est, *in vivo*, le partenaire de dimérisation de SIM1 (Michaud, J. L. et al. 2000).

Sim1 et *Sim2* démontrent un haut niveau de conservation dans leurs séquences N-terminales (90% de conservation dans les domaines bHLH-PAS), mais sont complètement divergents au niveau de leur C-terminal (Ema, M. et al. 1996; Fan, C. M. et al. 1996) laissant penser que ces deux gènes ont des activités transcriptionnelles différentes. Ceci est corroboré par le fait que la suppression du domaine C-terminal de ces deux protéines résulte en des protéines qui ont des activités transcriptionnelles

similaires (Moffett, P. and Pelletier, J. 2000). Dans des essais de transfection cellulaire, SIM1 augmente la transcription d'un gène rapporteur couplé à de multiples CME. Toutefois, cette activité est dépendante du domaine de transactivation d'ARNT/ARNT2. Il semble donc que le domaine C-terminal de SIM1 n'arbore aucune activité d'activation ou de répression de la transcription (Moffett, P. and Pelletier, J. 2000; Woods, S. L. and Whitelaw, M. L. 2002). Par ailleurs, des essais transcriptionnels avec des protéines de fusion GAL4/ARNT ont démontré que dans ce contexte SIM1 avait une activité répressive (Ema, M. et al. 1996). Il se peut donc que SIM1 ait des activités différentes selon la manière dont il est recruté au promoteur du gène cible et selon les partenaires avec lesquels il interagit. A l'inverse dans des essais similaires, il a toujours été démontré que SIM2 a une activité répressive qui passe par la séquestration du domaine de transactivation d'ARNT/ARNT2 (Ema, M. et al. 1996; Moffett, P. and Pelletier, J. 2000).

Dans le contexte *in vivo* du développement de l'hypothalamus antérieur, les gènes cibles régulés directement par *Sim1* et *Sim2* n'ont pas encore été identifiés. Toutefois, des approches de pertes de fonction chez les souris (revues dans Caqueret, A. et al. 2005b) et de surexpression de *Sim1* et *Arnt2* dans des lignées cellulaires couplée à une approche de micropuce (Liu, C. et al. 2003) ont permis d'identifier des cibles potentielles, directes ou non, de ces trois gènes. Les gènes agissant en amont de *Sim1* pour permettre son induction au cours du développement de l'hypothalamus ne sont également pas identifiés. Il est probable de penser que les médiateurs des 4 grandes voies de signalisation, - *Wnt*, TGF- β , *Shh*, BMP- qui sont essentiels pour la régionalisation de l'hypothalamus, puisse avoir un impact sur l'organisation précoce du PVN et sur l'expression de *Sim1* au sein de cette structure.

5.2 *Single-minded*, régulateur du développement neuronal chez la drosophile.

Chez la drosophile, *Sim*, l'orthologue de *Sim1* et *Sim2*, est également un régulateur important du développement neuronal. En effet, *Sim* est à la fois nécessaire et suffisant pour assurer le développement de la ligne médiane du SNC (Estes, P. et al.

2001). Sa perte de fonction chez la drosophile résulte en une absence complète des cellules de la ligne médiane (Nambu, J. R. et al. 1991). Alternativement, son expression ectopique dans le SNC latéral change le devenir de ces cellules en cellules de la ligne médiane (Nambu, J. R. et al. 1991; Thomas, J. B. et al. 1988). Au cours du développement de la ligne médiane, *Sim* agit comme un activateur transcriptionnel en se liant sous forme d'hétérodimère à *Tango*, l'homologue chez la drosophile d'*Arnt* et *Arnt2* (Sonnenfeld, M. et al. 1997). On observe donc une conservation de la fonction de ce gène chez les différentes espèces au cours de l'évolution. Également, la relation *Sim1-Brn2* semble avoir été conservée chez la drosophile. En effet, *Sim* régule l'expression de l'homologue de *Brn2*, *Drifter*, au cours du développement de la ligne médiane (Anderson, M. G. et al. 1995). Le rôle de *Sim* dans la différenciation cellulaire résulte, en partie, de l'activation directe ou indirecte de la transcription d'une vingtaine de gènes au cours du développement de la ligne médiane (Crews, S. T. 1998). *Sim* se profile donc comme un régulateur majeur du programme développemental de la ligne médiane chez la drosophile (Crews, S. T. 1998).

5.3 *Sim1* et *Sim2*, leurs fonctions dans l'hypothalamus en développement.

Le facteur de transcription *Sim1* est, tout comme *Sim*, un régulateur critique de la différenciation neuronale. Chez la souris, les lignées cellulaires qui composent le PVN, le SON et l'aPV ne se développent pas en son absence (Michaud, J. L. et al. 1998). *Sim2* est quant à lui essentiel pour la différenciation d'un grand nombre de cellules sécrétant la TRH et la SS au sein du PVN. Toutefois, ces deux gènes sont également impliqués dans le développement d'autres régions de l'hypothalamus, en particulier au niveau des corps mammillaires (CM). Ces noyaux de l'hypothalamus postérieur, situés de chaque côté de la ligne médiane, sont largement impliqués dans les processus de mémoire et de navigation spatiales (Vann, S. D. and Aggleton, J. P. 2003; Vann, S. D. and Aggleton, J. P. 2004). La fonction de ces deux processus est assurée par les CM et leurs différentes projections axonales vers le thalamus antérieur via le MTT (tractus mammillothalamique) et vers le tegmentum via le MTEG (tractus mammillotegmental). *Sim1* et *Sim2* qui sont exprimés au sein des CM prospectifs

semblent être essentiels pour le développement de ces deux faisceaux axonaux (Marion, J. F. et al. 2005). En l'absence de l'expression de ces deux gènes et de manière dose dépendante (la perte d'un ou des 2 allèles de chacun de ces gènes affecte différemment le phénotype), les projections axonales dérivant des CM et devant former le MTT et le MTEG adoptent un comportement erratique et croisent la ligne médiane au lieu de la longer (Fig. 13). L'étude des profils d'expression de gènes impliqués dans la guidance des cônes de croissance axonale tels que *Slits*, qui sont des signaux inhibiteurs situés le long de la ligne médiane, et *Robos*, qui sont les récepteurs des *Slits*, a permis de démontrer que chez les souris mutantes pour *Sim1/Sim2*, *Robo3* était exprimé de manière ectopique. L'expression ectopique de *Robo3*, qui inhibe la signalisation des *Slits*, pourrait expliquer du moins partiellement le phénotype observé au niveau des CM chez les souris mutantes pour *Sim1/Sim2* (Marion, J. F. et al. 2005, voir chapitre V annexe I). A la différence de leur relation au cours du développement du PVN, il n'y a pas d'interaction hiérarchique entre *Sim1* et *Sim2* au cours du développement des CM puisque l'expression de *Sim2* n'est pas affectée dans les CM de la souris mutante *Sim1*^{-/-}. Ces deux gènes semblent donc jouer un rôle similaire dans ce cadre-ci. Par ailleurs, leur partenaire d'interaction n'est pas ARNT2 puisque des analyses histologiques ont démontré que les projections axonales des CM sont normales chez les souris *Arnt2*^{-/-} (Marion, J. F. et al. 2005). SIM1 et SIM2 dimérisent probablement avec un autre membre de la famille bHLH-PAS au cours du développement des CM.

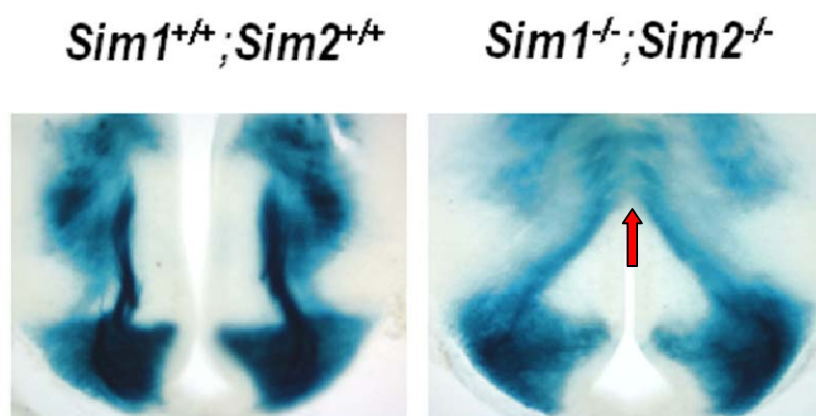


Figure 13. Coloration LacZ des projections axonales dérivant des corps mammillaires chez les embryons de souris E14.5 de type sauvage et mutants pour *Sim1/Sim2*. Noter le croisement des faisceaux axonaux (flèche rouge) au niveau de la ligne médiane chez les souris *Sim1^{-/-}/Sim2^{-/-}*. Figure adaptée de Marion, J.F et al. 2005. (voir chapitre VIII annexe I)

5.4 *Sim1*, sa fonction dans l'hypothalamus adulte.

Les souris homozygotes pour un allèle nul de *Sim1* décèdent rapidement après leur naissance probablement du à leurs défauts hypothalamiques même si cette possibilité reste à être validée (Michaud, J. L. et al. 1998). D'un autre côté, les souris hétérozygotes pour *Sim1* sont viables et fertiles mais développent une obésité précoce. Cette obésité semble résulter d'une hyperphagie sévère sans augmentation des dépenses énergétiques (Holder, J. L., Jr. et al. 2004; Michaud, J. L. et al. 2001). De manière intéressante ce phénotype est conservé chez les humains. Une translocation équilibrée, interrompant un des deux allèles du gène *Sim1* chez une enfant, a été associée à une obésité sévère résultant d'une hyperphagie (Holder, J. L., Jr. et al. 2000). De plus, l'identification chez plusieurs patients obèses d'une délétion interstitielle du chromosome 6q impliquant le locus de *Sim1* (6q16) (Bonaglia, M. C. et al. 2008; Faivre, L. et al. 2002; Varela, M. C. et al. 2006; Wang, J. C. et al. 2008), des études de liaisons génétiques reliant l'obésité infantile à la région chromosomale incluant *Sim1* (Meyre, D. et al. 2004) ainsi que l'identification de variants (*single nucleotide polymorphism*) dans le gène *Sim1* associés à une augmentation de l'index de masse corporel (Ahituv, N. et al. 2007; Hung, C. C. et al. 2007) ajoutent des évidences au fait que la perturbation de la fonction de *Sim1* puisse être associée à l'obésité chez l'humain.

Le PVN est un acteur critique dans le contrôle de l'appétit et des dépenses énergétiques. Il régule ces deux processus en faisant partie d'un circuit reliant le noyau arqué (ARC), un autre noyau hypothalamique qui répond à la leptine une hormone sécrétée par les adipocytes ayant des effets anorexigènes, et les neurones préganglionnaires du SNA qui agissent sur le tractus gastro-intestinal régulant ainsi la

prise alimentaire (Fig. 14, Swanson, L. W. and Sawchenko, P. E. 1983). La perturbation de la fonction du PVN est donc compatible avec l'hyperphagie présente chez les souris *Sim1*^{+/-}. Cette dysfonction pourrait avoir une origine développementale. En effet, le PVN des souris *Sim1*^{+/-} est hypocellulaire (Michaud, J. L. et al. 2001). Plusieurs neuropeptides caractérisant des types cellulaires majeurs au sein du PVN – OT (Olson, B. R. et al. 1991), CRH (Vettor, R. et al. 2002) et TRH (Choi, Y. H. et al. 2002) – ont été associés à des effets anorexigènes. Il est donc envisageable de penser que si un de ces types cellulaires est affecté par la perte de fonction de *Sim1*, il soit la cause de cette hyperphagie. Or récemment, il a été démontré que les niveaux d'expression d'*Ot* était diminué dans le PVN de ces souris et que ces neurones joueraient un rôle clé dans la régulation de l'appétit (Kublaoui, B. M. et al. 2008). Il reste cependant à savoir si cette diminution d'expression résulte d'une perte de cellules ou d'une diminution d'expression du gène *Ot* chez l'individu adulte. D'un autre côté, *Sim1* et *Arnt2* continuent également à être exprimés au sein du PVN chez l'individu adulte. L'hyperphagie présente chez les souris *Sim1*^{+/-} pourrait donc résulter non pas d'un défaut développemental mais plutôt de la perte d'un effet physiologique contrôlé par *Sim1*. Par exemple, SIM1 pourrait contrôler l'expression du gène *Ot*. Également, il a été démontré que des injections stéréotaxiques d'adénovirus modulant l'expression de *Sim1* dans le PVN de souris adulte influent sur la prise alimentaire (Yang, C. et al. 2006). Par ailleurs, l'utilisation d'un transgène surexprimant *Sim1* dans le PVN confirme également ces résultats (Kublaoui, B. M. et al. 2006). L'haploinsuffisance de *Sim1* pourrait donc provoquer une hyperphagie par la perturbation d'une voie physiologique même si on ne peut toutefois exclure le fait qu'un défaut développemental soit à l'origine de ce phénotype.

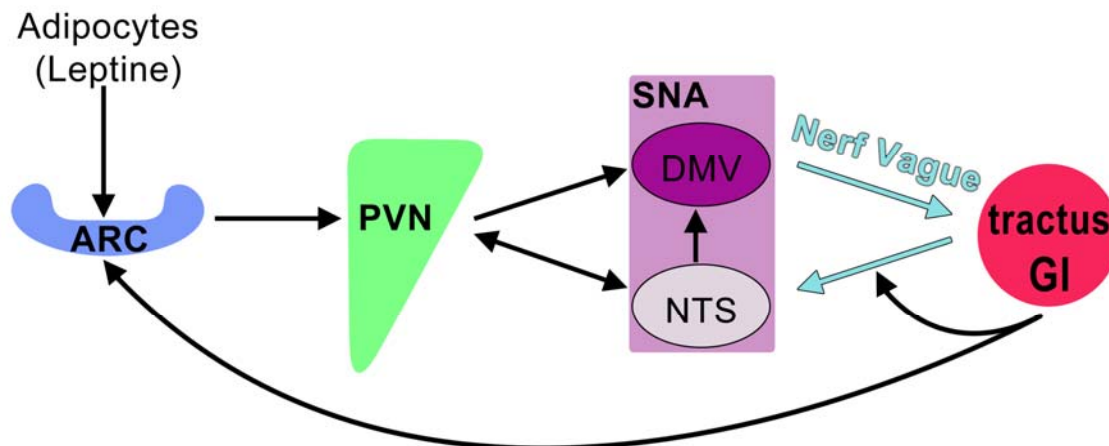


Figure 14. Régulation de l'équilibre énergétique par un circuit hypothalamique. Des signaux produits en périphérie (leptine) agissent sur l'hypothalamus (ARC et PVN) pour réduire la prise alimentaire et augmenter les dépenses énergétiques. Le PVN est relié au tractus gastro-intestinal (GI) via le système nerveux autonome (SNA). Le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMV) et ses projections induisent la sécrétion et la motilité gastrique contribuant à la sensation de faim. Le PVN projettent aussi au noyau du tractus solitaire (NTS) qui reçoit également des signaux du GI. Le NTS intègre ces signaux et modulent l'activité du DMV.

6. Le facteur de transcription OTP

Le facteur de transcription à homéodomaine *Orthopedia* (OTP) a été identifié simultanément chez la souris et la drosophile (Simeone, A. et al. 1994). Chez ces deux espèces, son expression est retrouvée au sein du SNC. Chez la souris, son expression est principalement localisée au niveau du diencéphale, du métencéphale et de la moelle épinière (Simeone, A. et al. 1994). Le gène *Otp* ainsi que son profil d'expression au niveau du SNC ont été relativement bien conservés au cours de l'évolution. Plusieurs orthologues ont été identifiés dans différentes espèces telles que le poisson-zèbre (Del, Giacco L. et al. 2006), le vers plat (*Dugesia japonica*) (Umesono, Y. et al. 1997) et les mollusques (*P. vulgata.*) (Nederbragt, A. J. et al. 2002). Finalement, *Otp* a aussi été

identifié chez les échinodermes où il joue un rôle dans la croissance du squelette (Amore, G. et al. 2003; Di, Bernardo M. et al. 1999).

6.1 Implication d'OTP au cours du développement de l'hypothalamus.

Chez la souris, au neuvième jour embryonnaire (E9.5), *Otp* est principalement exprimé au sein de la moelle épinière, du métencéphale et dans des domaines précis du prosencéphale. A partir de E12.5, l'expression d'*Otp* se trouve localisée au sein de l'hypothalamus antérieur et des régions supraoptique, paraventriculaire et rétrochiasmatique (Avantaggiato, V. et al. 1995; Simeone, A. et al. 1994) qui donneront naissance à l'aPV, au PVN, au SON et à l'ARC (Puelles, L. and Rubenstein, J. L. 1993).

Tout comme les souris *Sim1*^{-/-}, les souris homozygotes pour un allèle nul d'*Otp* meurent précocement après la naissance et ne développent pas les lignées neuroendocriniennes caractérisées par l'expression de OT, AVP, TRH, CRH et SS (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). Par ailleurs, ces souris présentent également des défauts au niveau de la prolifération cellulaire, sans effet apoptotique, et une migration anormale des cellules exprimant normalement *Otp* et devant former le PVN et le SON (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). *Otp* joue donc un rôle dans la survie, la migration et la différenciation de ces lignées cellulaires. Par ailleurs, l'expression de *Sim1* n'est pas affectée chez ces souris tout comme l'expression d'*Otp* n'est pas modifiée chez les souris *Sim1*^{-/-} laissant penser que ces deux gènes agissent en parallèle pour le développement du PVN, SON et de l'aPV (Acampora, D. et al. 1999).

A la différence de *Sim1*, *Otp* est également exprimé au sein de l'ARC. L'ARC est impliqué dans la régulation de processus physiologiques critiques incluant le contrôle de la sécrétion hypophysaire et fait partie d'un circuit de régulation de l'appétit comme présenté auparavant (Fig. 14). L'ARC est situé dans la partie médio-tubérale de l'hypothalamus (Fig. 1) et est composé de types cellulaires distincts caractérisables par l'expression de *Ghrh*, *Somatostatine*, *Tyrosine hydroxylase* (un marqueur des neurones dopaminergiques), *Neuropeptide Y* et *Proiomélanocortine* (Dickson, S. L. and

Luckman, S. M. 1997). Les souris qui sont déficientes pour OTP présentent un développement anormal des cellules SS au sein de ce noyau (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). Plus spécifiquement, OTP a été identifié comme faisant partie d'une cascade de facteurs de transcription qui est essentielle au développement des différentes lignées cellulaires qui composent l'ARC (Fig. 15). Au sein de cette cascade, *Otp* se situe en aval de *Nkx2.1*. En fait, les souris homozygotes pour un allèle nul de *Nkx2.1* n'ont pas de noyau arqué (Kimura, S. et al. 1996).

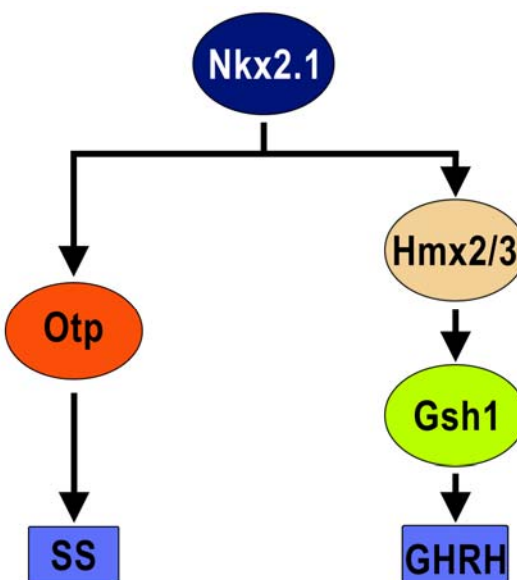


Figure 15. Cascade de facteurs de transcription requise pour la différenciation cellulaire au sein du noyau arqué. OTP est essentiel à la différenciation terminale des cellules sécrétant la somatostatine au sein de ce noyau.

Chez le poisson zèbre, deux orthologues d'*Otp* ont été clonés : *Otp1* (*Otpb*) et *Otp2* (*Otpa*) (Del, Giacco L. et al. 2006). L'étude de leur fonction, en inhibant leur expression à l'aide de morpholinos ou par l'étude des mutants *otpa^{m866}* (où *Otp2* est muté) et *mot* (un mutant présentant une diminution du nombre de neurones dopaminergiques), a démontré que ces derniers sont également essentiels à la différenciation de nombreux neurones dopaminergiques situés au sein de l'hypothalamus dorsal (Del, Giacco L. et al. 2006; Del, Giacco L. et al. 2008; Ryu, S. et al. 2007). Plus précisément, *Otp1* et *Otp2* sont exprimés dans les précurseurs postmitotiques ainsi que

dans les neurones dopaminergiques matures de l'hypothalamus chez le poisson-zèbre. Leur fonction au sein de ces précurseurs serait de contribuer à leur spécification et à leur différenciation en neurones dopaminergiques matures (Ryu, S. et al. 2007). Cette fonction est également conservée chez la souris. En effet, les neurones dopaminergiques du groupe A11 retrouvés au sein de l'hypothalamus sont absents chez les souris *Otp*^{-/-} (Ryu, S. et al. 2007). La fonction d'*Otp* dans la différenciation des neurones dopaminergiques semble donc être maintenue au cours de l'évolution, toutefois à une plus petite échelle chez les mammifères. En effet, à la différence du poissons-zèbre, chez la souris seule une portion des neurones dopaminergiques du diencéphale ventral requiert la fonction d'*Otp* pour leur différenciation.

6.2 Régulation d'OTP au cours du développement de l'hypothalamus.

Le poisson zèbre s'est révélé être un modèle précieux pour d'identifier des régulateurs de l'expression d'*Otp* au cours du développement de l'hypothalamus (revu dans Del, Giacco L. et al. 2008, Fig. 16). De manière intéressante, le profil d'expression d'*Otp1* est situé à proximité de centres exprimant des facteurs impliqués dans le développement précoce de l'hypothalamus comme *Shh*, *Nodal* et *Fgf8*. *Shh* est un régulateur positif de l'expression d'*Otp1* au niveau de l'hypothalamus antérieur. Sa perte d'expression chez le mutant *sonic you* est caractérisée par une diminution du profil d'expression d'*Otp1* dans l'hypothalamus antérieur (Del, Giacco L. et al. 2006). A l'inverse, chez le mutant *iguana*, où *dzip1* un répresseur de l'expression de *Shh* est absent, et chez des poissons zèbres où *Shh* est surexprimé il y a une expression ectopique d'*Otp1* (Del, Giacco L. et al. 2006). L'expression d'*Otp1* est également dépendante de *Nodal*. L'analyse de mutants *Cyclop* présentant des phénotypes moins sévères, où l'hypothalamus est réduit en taille mais non totalement absent, a permis de démontrer que l'expression d'*Otp1* était indirectement dépendante de *Nodal*. En effet, *Nodal* permet l'expression de *Shh* dans l'hypothalamus antérieur. La diminution d'expression de *Nodal* cause donc une réduction de l'expression de *Shh* affectant ainsi *Otp1* (Del, Giacco L. et al. 2006). L'expression d'*Otp1* est aussi contrôlée par *Fgf8*. Chez le mutant *acerebellar* où *Fgf8* est totalement aboli, l'expression d'*Otp1* est

augmentée au niveau de l'hypothalamus antérieur. En revanche, la surexpression de *Fgf8* chez des embryons de type sauvage provoque une répression de la transcription d'*Otp1* (Del, Giacco L. et al. 2006). Ces mêmes gènes sont aussi impliqués dans la régulation de l'expression d'*Otp1* dans la région postérieure de l'hypothalamus où naissent les neurones dopaminergiques (Del, Giacco L. et al. 2006). Récemment, deux autres gènes ont été identifiés comme jouant un rôle capital dans l'induction et la régulation d'*Otp1*, il s'agit de *Fez1* un facteur de transcription à doigts de zinc et *Pac1*, un récepteur couplé aux protéines G. L'étude du mutant *too few* a mis en lumière la fonction du gène *Fez1* qui est impliqué dans le développement des neurones à isotocine (équivalent de l'oxytocine chez le poisson zèbre) et des neurones dopaminergiques. *Fez1* régule l'expression d'*Otp1* en modulant sa transcription (Blechman, J. et al. 2007). De manière similaire, l'inhibition de l'expression de *Pac1* chez le poisson zèbre via des morpholinos résulte en une absence des mêmes types neuronaux. Toutefois, PAC1 ne régule pas la transcription d'*Otp1* mais agit plutôt sur ses niveaux protéiques. En effet, PAC1 et son ligand PACAP sembleraient contrôler les niveaux de synthèse protéique d'*Otp1* par un mécanisme post-transcriptionnel, non précisé par les auteurs de l'étude, sans toutefois affecter la stabilité de l'ARNm ou de la protéine (Blechman, J. et al. 2007). Sachant qu'OTP et SIM1 agissent en parallèle pour permettre le développement du PVN, il serait intéressant de vérifier si ces mêmes facteurs sont impliqués dans la régulation de l'expression de *Sim1*.

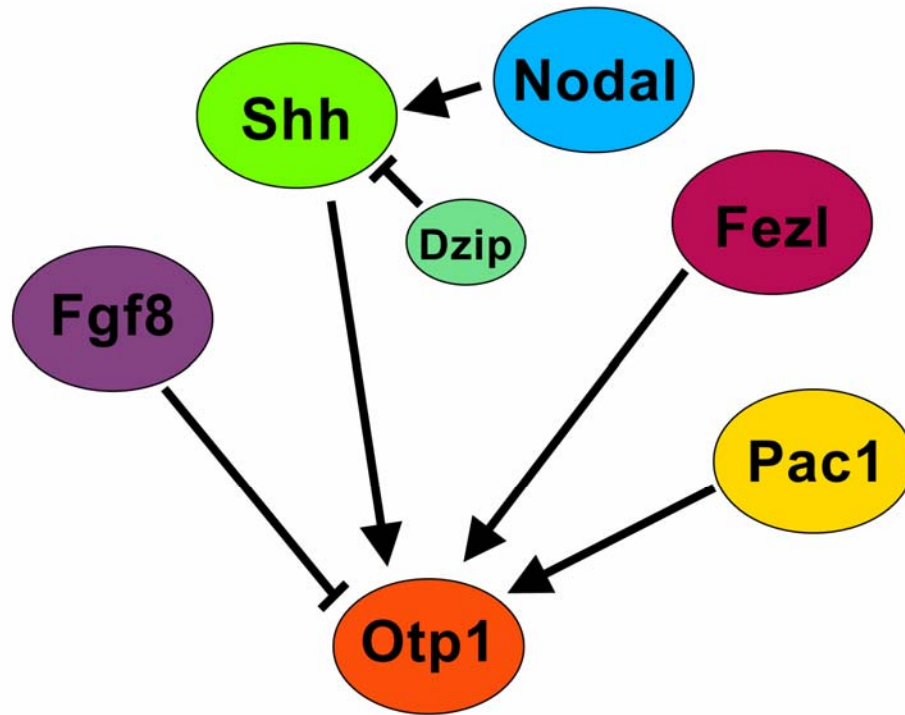


Figure 16. Régulateurs de l'expression d'*Otp1* au cours du développement de l'hypothalamus chez le poisson-zèbre. L'expression d'*Otp1* est régulée au niveau transcriptionnel par *Fgf8*, *Shh*, *Nodal* et *Fez1* alors que *Pac1* agit sur les niveaux protéiques d'*Otp1*.

7. *Sim1*, *Otp* et *Arnt2* voient leurs fonctions conservées au cours de l'évolution.

Tout récemment, la fonction de *Sim1*, *Otp* et *Arnt2* a largement été étudiée au cours du développement du poisson-zèbre. Le poisson-zèbre est un modèle avantageux pour étudier le rôle de gènes d'intérêt au cours du développement car on peut facilement inhiber leur expression par l'utilisation de morpholinos. Chez le poisson zèbre, les neurones à isotocine et vasotocine, qui correspondent aux neurones OT et AVP du PVN et du SON des mammifères, sont situés au sein de la région préoptique du diencéphale antérieur (Eaton, J. L. and Glasgow, E. 2006). Cette structure semble être l'homologue du PVN et du SON chez les mammifères puisqu'elle exprime les mêmes neuropeptides et qu'elle projette des axones à l'hypophyse (Eaton, J. L. and Glasgow, E. 2006). Après avoir démontré que *Sim1*, *Otp* et *Arnt2* sont coexprimés avec les ARNm codant pour

l'isotocine et la vasotocine au sein de la région préoptique, une approche par morpholinos a illustré que ces 3 gènes sont essentiels au développement de ces 2 types neuronaux chez le poisson zèbre (Eaton, J. L. et al. 2008; Eaton, J. L. and Glasgow, E. 2006; Eaton, J. L. and Glasgow, E. 2007). Également, chez le poisson zèbre *otpa^{m866}* où la fonction d'*Otp2* est abolie, il y a une diminution du nombre de neurones exprimant la CRH et la SS, démontrant aussi la conservation de la fonction d'*Otp* dans la différenciation de ces 2 lignées neuronales (Ryu, S. et al. 2007). De plus, l'expression de l'ARNm d'*Otp* n'est pas affectée par *Sim1* tout comme l'expression de *Sim1* ne semble pas non plus être affectée par *Otp* (Eaton, J. L. and Glasgow, E. 2007). Comme chez la souris, ces deux gènes semblent donc agir par des voies parallèles laissant supposer qu'ils pourraient contrôler la différenciation de ces types cellulaires en se liant et en agissant en tandem sur les promoteurs de gènes spécifiques à ces types neuronaux (Eaton, J. L. and Glasgow, E. 2007). Quoiqu'il en soit, la conservation des profils d'expression et de la fonction de ces trois gènes au cours de l'évolution révèle le rôle capital qu'ils ont à jouer au cours du développement de l'hypothalamus et renforce l'idée que la perturbation de leurs expressions puisse être associée à des désordres neuroendocriniens dont la cause n'est pas encore identifiée chez l'humain.

8. Le facteur de transcription BRN2.

OTP n'est pas le seul facteur de transcription à homéodomaine impliqué dans le développement du PVN. En effet, *Brn2* fait partie d'une famille de facteurs de transcription à homéodomaine caractérisée par deux domaines POU qui sont essentiels à la liaison de la protéine à son ADN cible. Plus de 20 facteurs de transcription à domaines POU ont été clonés et caractérisés parmi plusieurs espèces (Li, P. et al. 1993). Ces différents facteurs ont été classés en 6 catégories selon leur similarité de séquence primaire. *Brn2* fait partie de la classe III de même que *Brn1*, *Brn4* et *Tst-1* (Li, P. et al. 1993). Ces quatre gènes sont fortement exprimés au sein du cerveau et du système nerveux périphérique (Alvarez-Bolado, G. et al. 1995). Au cours du développement, *Brn2* est largement exprimé dans tout le SNC. Après E10.5, son profil d'expression se restreint à des régions définies du SNC principalement au sein du diencephale ventral.

Brn2 et *Brn4* ont par ailleurs des profils d'expression très similaires au cours du développement de l'hypothalamus (Schonemann, M. D. et al. 1995). La création de souris homozygote pour un allèle nul de *Brn2* a permis d'évaluer la fonction de ce gène au cours du développement de l'hypothalamus. Il s'avère que *Brn2* est essentiel à la différenciation terminale des neurones magnocellulaires et des neurones parvocellulaires exprimant la CRH du PVN et du SON (Nakai, S. et al. 1995; Schonemann, M. D. et al. 1995). Les neurones parvocellulaires exprimant la TRH et la SS ne sont pas affectés par la perte d'expression de *Brn2* toutefois le PVN de ces souris présente une topographie désorganisée (Nakai, S. et al. 1995; Schonemann, M. D. et al. 1995). Toutefois, *Brn2* ne semble pas être nécessaire pour les étapes précoces du développement du PVN et du SON. En effet, les PVN et SON naissants des embryons de souris *Brn2*^{-/-} sont histologiquement comparables à ceux des embryons de souris de type sauvage (Nakai, S. et al. 1995; Schonemann, M. D. et al. 1995). Cependant, aucun neurone positif pour AVP, OT et CRH n'est détecté à partir de E14.5 (Nakai, S. et al. 1995; Schonemann, M. D. et al. 1995). *Brn2* semble donc être essentiel à l'activation de l'expression de gènes requis pour la différenciation cellulaire de ces neurones. Par ailleurs, il a été démontré que *Brn2* est capable de lier le promoteur de CRH et d'en activer son expression dans un contexte *in vitro* (Li, P. et al. 1993; Ramkumar, T. and Adler, S. 1999; Schonemann, M. D. et al. 1995). Toutefois, l'injection stéréotaxique d'adénovirus surexprimant *Brn2* au sein du PVN de rat adulte ne semble avoir aucun effet sur les niveaux d'expression d'AVP et CRH (Wong, L. F. and Murphy, D. 2003). Plusieurs raisons peuvent expliquer pourquoi la surexpression de *Brn2 in vivo* n'a aucun impact sur l'expression d'AVP et CRH telles que l'interaction avec d'autres facteurs limitants ou la régulation de l'activité de *Brn2* au-delà d'un seuil critique (Wong, L. F. and Murphy, D. 2003). Quoiqu'il en soit, *Brn2* est essentiel au cours du développement hypothalamique pour assurer la différenciation terminale des neurones magnocellulaires exprimant l'OT et l'AVP et parvocellulaires exprimant la CRH au sein du PVN et du SON.

9. Hypothèses et objectifs

De par sa relative simplicité, le PVN représente un modèle intéressant pour étudier les mécanismes qui sous-tendent la différenciation neuronale. De plus, les gènes qui participent au développement du PVN ont le potentiel d'être associés à des pathologies cliniques. La perte ou le gain de fonction de ces gènes pourrait causer une dysfonction du PVN en interférant avec son développement. Également, ces gènes pourraient être recrutés dans les cellules matures du PVN pour contrôler l'expression d'effecteurs comme les hormones ou les neurotransmetteurs. Ainsi, des mutations dans ces gènes pourraient aussi perturber la physiologie du PVN. Le laboratoire d'accueil a observé que les souris *Sim1*^{+/-} sont hyperphagiques et deviennent obèses, probablement à cause d'une dysfonction du PVN. Les autres gènes qui sont requis pour le développement du PVN – *Arnt2*, *Brn2*, *Otp* et ceux que j'identifierai dans le cadre de mon projet – se présentent donc comme des causes potentielles de l'obésité.

Mon projet vise donc à disséquer le programme développemental du PVN en utilisant différentes approches :

1. J'ai caractérisé le développement de l'hypothalamus antérieur chez l'embryon de poulet qui constitue un système propice pour les études fonctionnelles durant le développement de cette structure.
2. J'ai travaillé à identifier le transcriptome du PVN à différents stades du développement embryonnaire de la souris. Les gènes identifiés dans le cadre de ces expériences représentent des régulateurs potentiels du développement hypothalamique.
3. J'ai généré le premier transgène qui est exprimé spécifiquement au sein du PVN. Ce transgène constitue un outil critique pour la dissection du programme développemental de l'hypothalamus.

CHAPITRE II: Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo.

Publié dans:

Developmental Dynamics, 233 (2), 652-658, 2005

Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo.

Aurore Caqueret¹, Pascal Coumailleau², Jacques L. Michaud^{1*}

¹Research Center, Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Canada

²Université Pierre et Marie Curie, CNRS UMR 7622, Paris, France

*Correspondence: Jacques L. Michaud,

Research Center,

Hôpital Sainte-Justine,

3175 Côte Sainte-Catherine,

Montreal, Quebec,

Canada H3T 1C5

Keywords

hypothalamus • neuroendocrine cells • transcription factors • chick embryo

Contribution :

J'ai participé, en compagnie de mon directeur de recherche Jacques L. Michaud, à la conception de toutes les expériences présentes dans cet article. J'ai réalisé l'ensemble des expériences dont découlent les résultats publiés dans cet article. J'ai réalisé l'écriture de cet article en collaboration étroite avec mon directeur de recherche Jacques L. Michaud. Le Dr Pascal Coumilleau a révisé le manuscrit.

Abstract

Loss-of-function experiments in mice have shown that the transcription factors *Sim1*, *Otp*, *Sim2*, and *Brn2* form a cascade essential for the differentiation of neuroendocrine cells of the anterior hypothalamus that produce vasopressin, oxytocin, somatostatin (SS), thyrotropin-releasing hormone (TRH), and corticotropin-releasing hormone (CRH). Very little is known about how the differentiation of these cell types is regulated in chick. Here, we report the cloning of the chick homolog of *Otp*. Moreover, we have systematically compared the expression of *Sim1*, *Sim2*, *Brn2*, and *Otp* with that of the markers of terminal differentiation TRH, SS, CRH, vasotocin, and mesotocin during development of chick embryos. We have found that the cell types studied generally develop in domains expressing these transcriptional regulators but that the pattern of neuronal differentiation and the spatial distribution of some regulators were not the same as in mice. Our results provide a framework useful for the functional analysis of hypothalamus development in chick.

Introduction

The paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus is a critical regulator of several physiological processes, including the control of appetite and blood pressure (Swanson, L.W. and Sawchenko, P.E. 1983). The PVN contains two major types of neurons: magnocellular and parvocellular. Magnocellular neurons project their axons to the posterior pituitary where they secrete two hormones, oxytocin (OT) and vasopressin (VP), directly into the general circulation. The supraoptic nucleus (SON), which is derived from the developing PVN region, is composed of the same types of magnocellular neurons. Parvocellular neurons of the PVN project their axons to the medial eminence where they release several hormones, including the thyrotropin-releasing hormone (TRH) and the corticotropin-releasing hormone (CRH). These hormones are transported by the portal vasculature to the anterior lobe of the pituitary, where they modulate the secretion of several pituitary hormones. The anterior periventricular nucleus (APV), a nucleus located ventrally contiguous to the PVN, contains somatostatin (SS) -producing neurons that also project to the medial eminence.

A cascade of transcription factors has been shown to control the differentiation of several neuroendocrine cells of the anterior hypothalamus, including these APV/PVN/SON neurons, in mice. The basic helix-loop-helix (bHLH) -PAS transcription SIM1 and its dimerizing partner ARNT2 are required for the differentiation of (1) virtually all neurons of the PVN and SON, including those producing TRH, CRH, OT, and AVP; (2) SS parvocellular neurons of the APV; and (3) other populations of hypothalamic TRH neurons found in lateral areas and the preoptic region (Michaud, J. L. et al. 1998, Michaud, J. L. et al. 2000). The homeodomain-containing OTP acts in parallel for the differentiation of the same cell types (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). SIM1:ARNT2 and OTP control the differentiation of two populations of neurons through distinct pathways. First, they both act upstream to maintain the expression of the POU-domain BRN2, which, in turn, is required for the differentiation of CRH-, AVP-, and OT-producing cells (Nakai, S. et al. 1995; Schonemann, M. D. et al. 1995). Second, SIM1:ARNT2 and OTP are required for *Sim2* expression in the developing hypothalamus (Wang, W. and Lufkin, T. 2000; Goshu, E.

et al. 2004). In the absence of *Sim2*, a majority of SS cells of the APV and of TRH cells of the PVN, lateral areas, and the preoptic region do not develop (Goshu, E. et al. 2004). It is not clear whether *Sim1* and *Otp* control the differentiation of the smaller population of TRH and SS cells, which do not require *Sim2*, directly or through other transcription factors. These studies have also provided some evidence that the different APV/PVN/SON cell types have distinct spatial origins, because *Brn2* is expressed in a domain more anterior and medial than that of *Sim2* during early development (Goshu, E. et al. 2004).

Because of its relative simplicity, the anterior hypothalamus represents an interesting system to dissect the mechanisms underlying the generation of cell diversity and the formation of brain nuclei. In a first step toward the use of the chick model to study the development of the anterior hypothalamus, we have systematically compared the expression of the regulators and markers of terminal differentiation mentioned above. We found that the anterior hypothalamus of the chick embryo is characterized by the expression of combinations of transcription factors that correlate with the emergence of distinct cell types.

Results and discussion

By using degenerated primers, we amplified a cDNA corresponding to 85% of the chick coding sequence of *Otp*. The corresponding amino acid sequence shows 95% identity with that of its human and mice counterparts. A 781-bp *Sim2* cDNA clone containing sequences coding for the bHLH and PAS domains was obtained from the UK MRC HGMP Resource Center. The corresponding amino acid sequence shows 97% identity with that of its mouse counterpart. Messenger RNA sequences for the chick homologs of *Sim1*, *Brn2*, *Avt*, *Ot*, *Ss*, *Crh*, and *Trh* were already available (Table 1; Ivell, R. et al. 1990; Barth, S. W. et al. 1997; Liu, Y. et al. 2000). Of note, the avian equivalent of oxytocin is named mesotocin (Mt), whereas that of vasopressin is named vasotocin (AVT).

We systematically compared by in situ hybridization the expression of these markers in the developing anterior hypothalamus from Hamburger and Hamilton stage (HH) 10 to HH17 and at HH19, HH20, HH26/27, HH35, and HH39. *Sim1* and *Otp* begin to be expressed in the presumptive anterior hypothalamus at HH14 in scattered cells that are located in the same domain of the lateral neuroepithelium (Fig. 1a, b). The lateral location of these cells suggests that they correspond to newly born neurons. *Brn2* and *Sim2* are expressed in the whole thickness of the neuroepithelium, the former in an extended dorsoventral domain that spans the hypothalamus, and the latter in a more restricted domain that corresponds to those of *Sim1* and *Otp* (Fig. 1a-c and data not shown). These expression patterns of *Sim1*, *Sim2*, *Otp*, and *Brn2* persist at least until HH17. *Mt*, the expression of which is first detected at HH16 in a few cells contained within the *Sim1/Otp* domain (data not shown), is the only marker of terminal differentiation studied that is expressed at these early stages.

At HH19-HH20, *Sim1*, *Sim2*, and *Otp* are expressed in a similar domain, presumably corresponding to the mantle layer (Fig. 2a, i, q; b, j, r, and d, l, t). At these stages, *Brn2* transcripts are still detectable in the whole thickness of the neuroepithelium (Fig. 2c, k, s). *Ss* expression is first detected at HH19-HH20 in a few cells, which are located in the anterior part of the *Sim1/Sim2/Otp* domain (Fig. 2f). *Avt* also starts to be expressed at the same stage but in the posterior part of this domain. *Avt* and *Mt* expression domains appear to coincide with each other and with those of *Sim1/Sim2/Otp* (Fig. 2g, o, w, and h, p, x).

At HH26/HH27, important changes are observed in the expression patterns of the markers along the anterior-posterior axis of the anterior hypothalamus. Anteriorly, *Sim1*, *Sim2* and *Otp* are coexpressed in the same domain (Fig. 3a-h). At that level, *Avt*, *Mt*, and *Ss* are expressed in a few scattered cells that are included in the *Sim1/Sim2/Otp* domain, whereas *Brn2* expression is not detectable. *Ss* is also expressed more dorsally and ventrally in areas that do not express any of the transcription factors studied, suggesting that other pathways than that regulated by *Sim1/Sim2/Otp* are involved in the

differentiation of this cell type. Posteriorly, the *Sim1/Sim2/Otp* domain becomes elongated, extending more ventrally (Fig. 3i-p). *Sim1* and *Sim2* are expressed in complementary domains of the mantle layer, the former medially compared with the latter, whereas *Otp* expression is found in both domains. At that level, *Brn2* expression is detected in the medial domain, overlapping with the dorsal aspect of the *Sim1* and *Otp* domains. The ventral *Sim1/Sim2/Otp* domain gives rise to yet unidentified cell types. *Avt*- and *Mt*-expressing cells are contained in the dorsal part of the *Sim2* and *Otp* domains. *Avt*-expressing cells can also be found more medially in the *Sim1/Brn2* domain. In the posterior hypothalamus, a distinct domain expressing all four transcription factors as well as *Avt* is observed (Fig. 3q-x). The expression of *Avt* in this region appears transient, because it was not detectable at later stages.

Detailed immunohistochemical studies have suggested that most VT/MT-producing cells of the diencephalon originate from a patch of neuroepithelium centered on the prospective PVN/SON region, most likely corresponding to the *Sim1/Sim2/Otp/Brn2* domain described in Figure 3a-p (Arnold-Aldea, S. A. and Sterritt, C. 1996). Some of these VT/MT neurons would populate the PVN/SON, while others would migrate further away to settle in various areas of the diencephalon. Outside of the diencephalon, the only site of *Avt* and *Mt* expression during development appears to be the prospective nucleus of Edinger-Westphal (EWN) located in the mesencephalon (Arnold-Aldea, S. A. and Sterritt, C. 1996). EWN is a preganglionic parasympathetic cell group that regulates several neurovegetative ocular functions. Indeed, we have found expression of *Avt* and *Mt* in the prospective EWN at HH26 (Fig. 4a-f). Of interest, *Sim1* and *Sim2* but not *Otp* nor *Brn2*, are coexpressed in this site of VT/MT production. This observation would suggest that *Sim1* and *Sim2* can direct the development of *Avt*- and *Mt*-expressing cells in the absence of *Otp* and *Brn2*. However, the biological relevance of these EWN cells appears unclear, because they stop expressing *Avt* and *Mt* around HH40 (Arnold-Aldea, S. A. and Sterritt, C. 1996; data not shown). Moreover, the expression of *Avp* and *Ot* has not been reported in EWN of mice even though *Sim1*, *Sim2*, and *Brn2* are coexpressed in this structure (Michaud et al., unpublished results).

At HH35, *Avt* and *Mt* are expressed by a large number of cells located in the presumptive PVN but also by a few scattered cells found more laterally (not shown). At that stage, *Trh* expression is not detectable in the diencephalon whereas *Crh* transcripts are present in various areas of the diencephalon but not in the hypothalamus. The transcription factors studied here are not expressed in these areas of *Crh* expression. At HH39, *Otp* expression extends more anteriorly than that of the other regulators in a domain that contains *Ss*-, *Avt*-, and *Mt*-expressing cells (Fig. 5a-i). Posteriorly, expression patterns of the regulators show a similar spatial relationship as that observed at HH26/27 (Fig. 5j-aa). *Sim1*, *Brn2*, and *Otp* transcripts are detected in a medial domain corresponding to the prospective PVN, although the expression level of these first two factors is quite low (Fig. 5j-l, s-u). *Trh*- and *Crh*-expressing cells are found within this domain, whereas AVT and MT neurons are found abundantly in a large domain that extends beyond that of *Sim1/Brn2/Otp* (Fig. 5o-r). At that stage, the prospective PVN is the only site of *Trh* expression in the diencephalon. Of note, *Sim2* and *Otp* are expressed in a lateral domain in which *Ss*-expressing cells are found (Fig. 5k, m). *Avt*- and *Mt*-expressing cells are first observed in the SON at HH39 (not shown). These cells express *Otp* but not *Sim1*, *Sim2* or *Brn2*.

This study shows that the transcriptional regulators *Sim1*, *Sim2*, *Otp*, and *Brn2* are expressed in regions of the hypothalamus in which neuroendocrine cell types emerge. At the early stages of their expression, all the markers of terminal differentiation that we have studied, with the exception of *Ss*, are found in domains of the hypothalamus in which at least some of these regulators are expressed. Only a small portion of the domain of *Ss* expression overlaps with those of the regulators. At later stages, the expression of the regulators is not maintained in an important proportion of *Avt*- and *Mt*-expressing neurons of the PVN and SON regions (for instance, compare Fig. 5b with q, r), suggesting that they are mainly involved with the early specification of these cells. In contrast, the expression of *Sim1* and *Otp*, in mouse embryo, is maintained at least until birth in virtually all neurons of the PVN and SON.

The anterior hypothalamus of chick HH26 embryo is subdivided into a lateral domain that expresses *Sim2* and a medial one that expresses *Sim1* and *Brn2*, whereas *Otp* transcripts are produced in these two domains (Fig. 2i-p). Moreover, *Brn2* is not expressed as anteriorly as *Sim1*, *Sim2*, and *Otp*. These expression patterns are similar to those observed in E11.5-E13.5 mouse embryos, with the difference that *Sim1* and *Otp* show near-identical expression in this model. That *Sim2* and *Sim1/Brn2* are expressed in distinct domains suggests that they control the development of different cell types, as it is the case in mice. For instance, in both models, some *Ss*-expressing cells emerge in an anterior domain that expresses *Sim1*, *Sim2*, and *Otp* but not *Brn2*, whereas *Crh* and at least some *Avp/Avt* neurons emerge in the *Brn2*-expressing domain. However, it is difficult to draw definitive correlations between mice and chick development in the absence of functional data for the latter model. Moreover, there are some differences between the two models. TRH-producing cells are the first of the cell types studied to arise in the anterior hypothalamus of mouse embryos, initially occupying, with *Sim2*, the most lateral aspect of the neuroepithelium and eventually populating the lateral hypothalamus. In contrast, the first markers of terminal differentiation to be detectable in the anterior hypothalamus of chick embryo are *Mt* and *Avt*, which are expressed in domains that overlap with those of *Sim2* and *Brn2*, whereas TRH neurons will not appear until HH35-HH40, approximately 10 days later. Therefore, populations of hypothalamic neurons in the chick embryo appear to develop in a different temporal sequence compared with mice. All together, these results suggest that, although the same transcription factors are expressed during development of the anterior hypothalamus in mice and in chick, they appear to function in a different context, in some cases possibly acting in different cell types.

Experimental Procedures

Cloning of Chick Probes

Amplification of *Otp* cDNA was performed using the consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primer polymerase chain reaction (PCR) strategy (CODEHOP) (Rose, T. M. et al. 2003). The sequences of CODEHOP primers, derived from the conserved regions of mouse, zebrafish, and human OTP protein sequences, were as follows:

forward, 5'CGAGCTGCTGGGGCAYMGNGARGC3'; reverse, 5'AGGGAGGCGATGGAGGTN-CCNCKCCA3'. Total RNA from chick embryonic hypothalamus (HH40) was used for reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). PCR was carried out at 94°C for 45 sec, 66°C for 45 sec, and 72°C for 45 sec, for a total of 40 cycles.

Partial cDNAs for *c-Brn2*, *c-Avt*, *c-Crh*, *c-Mt*, *c-Ss*, and *c-Trh* were generated by RT-PCR using total RNA purified from chick embryonic hypothalamus, as previously described (Michaud, J. L. et al. 1998). Primers were deduced from previously reported chick or quail mRNA sequences (Table 1). The *Sim2* clone (id: ChEST225e10) was obtained from the UK MRC HGMP Resource Center (<http://www.chick.umist.ac.uk>). The *Sim1* plasmid was a generous gift of C-M Fan (Pourquié, O. et al. 1996).

In Situ Hybridization

Chick embryos were staged according to Hamburger and Hamilton (Hamburger, V. and Hamilton, H. L. 1951). Embryos were fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde (PFA) and processed for coronal cryosections at 8 µm. In situ hybridization on tissue sections was performed as described in Strähle et al. (Strähle, U. et al. 1994) with the following modifications. Slides were post-fixed in PFA 4% for 20 min at room temperature and treated with proteinase K for 7 min at 37°C. Hybridizations were performed overnight at 70°C. After hybridization, slides were washed as previously described (Strähle, U. et al. 1994) and blocked for 1.5 hr at room temperature in 2% goat serum-2% blocking reagent in MABT. Antisense RNA probes were labeled with digoxigenin according to manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). The probes were detected by an alkaline phosphatase-coupled antibody using nitroblue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) as the chromogenic substrate for alkaline phosphatase. After hybridization, the slides were washed in PBS and mounted in Kayser's glycerogel.

Acknowledgements

J.L.M. is a clinician-scientist from the CIHR.

References:

- Acampora, D., Postiglione, M. P., Avantaggiato, V., Di Bonito, M., Vaccarino, F. M., Michaud, J., Simeone, A. (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the *Orthopedia* gene. *Genes Dev.* 13: 2787-2800.
- Arnold-Aldea, S. A., Sterritt, C. (1996) Sites of origin and patterns of migration of vasotocin/mesotocin neurons in developing brain of the chick. *J. Neurobiol.* 31: 103-116.
- Barth, S. W., Bathgate, R. A. D., Mess, A., Parry, L. J., Ivell, I., Grossmann, R. (1997) Mesotocin gene expression in the diencephalon of domestic fowl: cloning and sequencing of the MT cDNA and distribution of MT gene expressing neurons in the chicken hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 9: 777-787.
- Goshu, E., Hui, J., Marion, J. F., Michaud, J. L., Fan, C-M. (2004) Sim2 defines region-specific neuroendocrine cell types in the anterior hypothalamus. *Mol. Endocrinol.* 18: 1251-1262.
- Hamburger, V., Hamilton, H. L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 49-92.
- Ivell, R., Hunt, N., Abend, N., Brackman, B., Nollmeyer, D., Lamsa, J. C., McCracken, J. A. (1990) Structure and ovarian expression of the oxytocin gene in sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 2: 703-711.
- Liu, Y., Xue, J., Zhang, W., Fu, D., He, R., Xue, Z. (2000) qBrain-2, a POU domain gene expressed in quail embryos. *Biochim. Biophys. Acta.* 1491: 27-36.
- Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R., Fan, C-M. (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 12: 3264-3275.

- Michaud, J. L., DeRossi, C., May, N. R., Holdener, B. C., Fan C-M. (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech. Dev.* 90: 253-261.
- Nakai, S., Kawano, H., Yudate, T., Nishi, M., Kuno, J., Nagata, A., Jishage, K., Hamada, H., Fujii, H., Kawamura, K. (1995) The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev.* 9: 3109-3121.
- Pourquié, O., Fan, C-M., Coltey, M., Hirsinger, E., Watanabe, Y., Breant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M., Le Douarin, N. M. (1996) Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell* 84: 461-471.
- Rose, T. M., Henikoff, J. G., Henikoff, S. (2003) CODEHOP (CONsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res.* 31: 3763-3766.
- Schonemann, M. D., Ryan, A. K., McEvelly, R. J., O'Connell, C. A. (1995). Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor BRN2. *Genes Dev.* 9: 3122-3135.
- Strähle, U., Blader, P., Adam, J., Ingham, P. W. (1994) A simple and efficient procedure for non-isotopic in situ hybridization to sectioned material. *Trends Genet.* 10: 74-76.
- Swanson, L. W., Sawchenko, P. E. (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* 6: 269-324.
- Wang, W., Lufkin, T. (2000) The murine otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev. Biol.* 227: 432-449.

Table 1. Sequences of Chick Probes

Probe name	Reference	NCBI accession No.	Position of forward primer	Position of reverse primer	Probe size (bp)
<i>c-Brn2</i>	Liu, Y. et al., 2000	AF091043	824 to 843	1166 to 1185	361
<i>c-Avt</i>	Ivell, R. et al., 1990	X55130	37 to 56	431 to 450	413
<i>c-Crh</i>	-	AJ621492	89 to 108	579 to 598	509
<i>c-Ss</i>	-	X60191	172 to 191	629 to 648	476
<i>c-Trh</i>	-	AJ703806	5 to 24	554 to 573	549
<i>c-Mt</i>	Barth, S. W. et al., 1997	-	5 to 24	447 to 466	451
<i>c-Otp</i>	This report	AY651764	-	-	850
<i>c-Sim1</i>	Pourquié, O. et al., 1996	U40058 ^a	-	-	600

^a This 261-bp sequence represents a subset of the entire sequence of the 600-bp fragment described by Pourquié, O. et al. (Pourquié, O. et al. 1993).

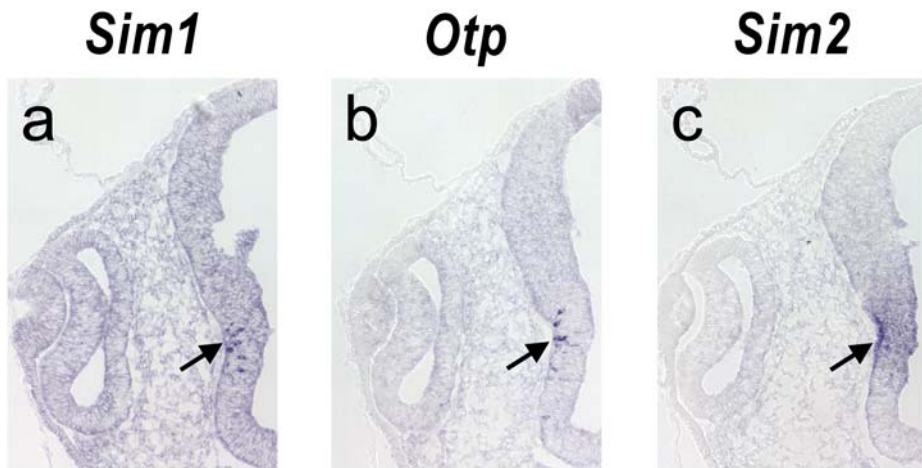


Figure 1.

Figure 1. Expression of *Sim1*, *Sim2*, and *Otp* in the hypothalamus of Hamburger and Hamilton stage (HH) 14 chick embryo. a-c: Coronal adjacent sections through the prospective anterior hypothalamus of an HH14 chick embryo were hybridized with the *Sim1* (a), *Sim2* (b), or *Otp* (c) probes. Arrows show areas of expression.

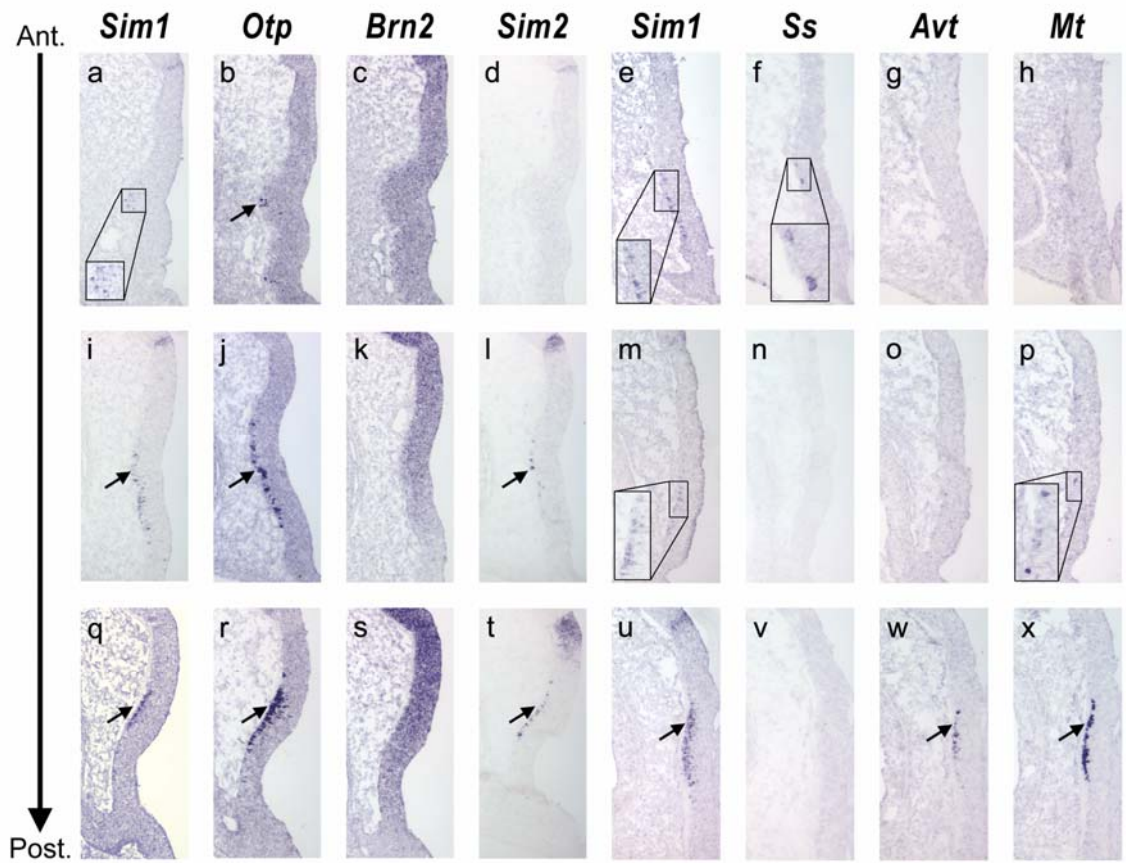


Figure 2.

Figure 2. Expression of transcription factors and markers of terminal differentiation in Hamburger and Hamilton stage (HH) 20 hypothalamus. a-x: Comparison of *Sim1* (a, i, q and e, m, u), *Otp* (b, j, r), *Brn2* (c, k, s), *Sim2* (d, l, t), *Ss* (f, n, v), *Avt* (g, o, w), and *Mt* (h,p,x) expression in the prospective anterior hypothalamus of an HH20 chick embryo. One set of coronal adjacent sections was hybridized with *Sim1*, *Otp*, *Brn2*, and *Sim2* probes, whereas another set of adjacent sections was hybridized with *Sim1*, *Ss*, *Avt*, and *Mt*. Sections a-h correspond to the same level of the hypothalamus, located 150 and 300 μm anteriorly from the level of sections i-p and q-x, respectively. Arrows indicate areas of expression.

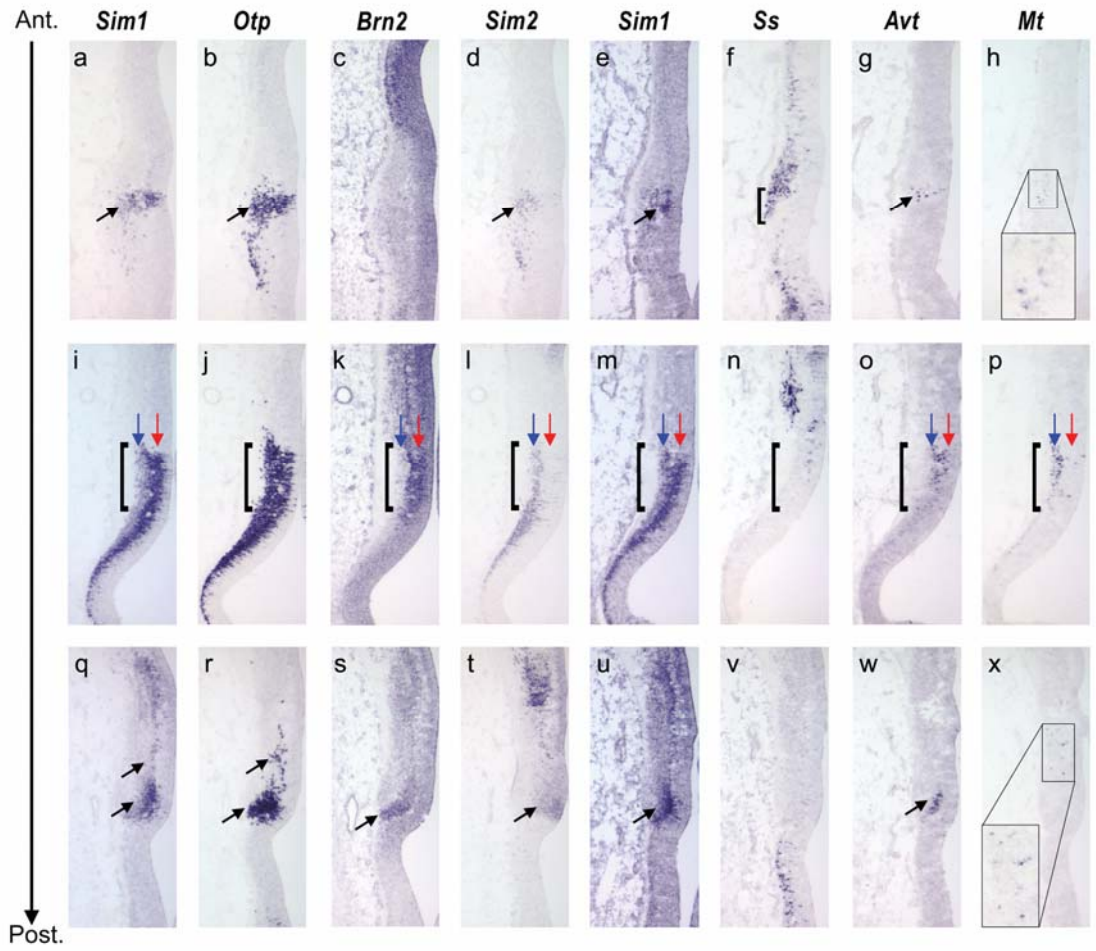


Figure 3.

Figure 3. Expression of transcription factors and markers of terminal differentiation in Hamburger and Hamilton stage (HH) 26 hypothalamus. Comparison of *Sim1* (a, i, q and e, m, u), *Otp* (b, j, r), *Brn2* (c, k, s), *Sim2* (d, l, t), *Ss* (f, n, v), *Avt* (g, o, w), and *Mt* (h, p, x) expression in the prospective anterior hypothalamus of an HH26 chick embryo. One set of coronal adjacent sections was hybridized with *Sim1*, *Otp*, *Brn2*, and *Sim2* probes, whereas another set of adjacent sections was hybridized with *Sim1*, *Ss*, *Avt*, and *Mt* probes. Sections a-h correspond to the same level of the hypothalamus, located 450 and 950 μm anteriorly from the level of sections i-p and q-x, respectively. In a-h, arrows and the bracket indicate regions of overlapping expression of the 7 markers. In i-p, the blue arrows indicate the lateral domain, whereas the red arrows indicate the medial domain of expression of markers. The brackets indicate the dorsal aspect of the *Sim1/Sim2/Otp* domain. In q-x, arrows indicate a novel domain of *Sim1/Otp/Brn2/Sim2/Avt* expression that is distinct from that shown in a-p.

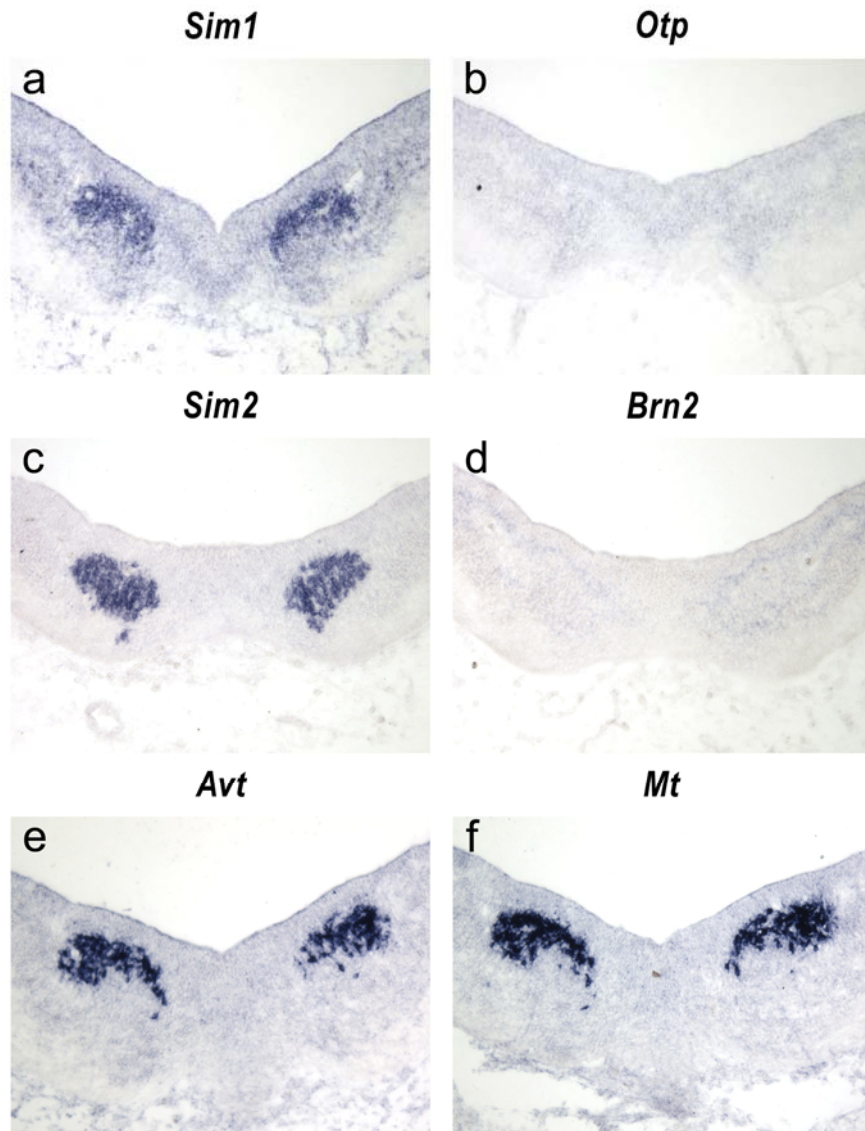


Figure 4.

Figure 4. Expression of transcription factors and markers of terminal differentiation in the nucleus of Edinger-Westphal of HH26 chick embryo. a-f: Coronal sections through the prospective Edinger-Westphal nucleus were hybridized with *Sim1* (a), *Otp* (b), *Sim2* (c), *Brn2* (d), *Avt* (e), and *Mt* (f) probes. a,b and c,d and e,f correspond to the three sets of adjacent sections originating from the same region.

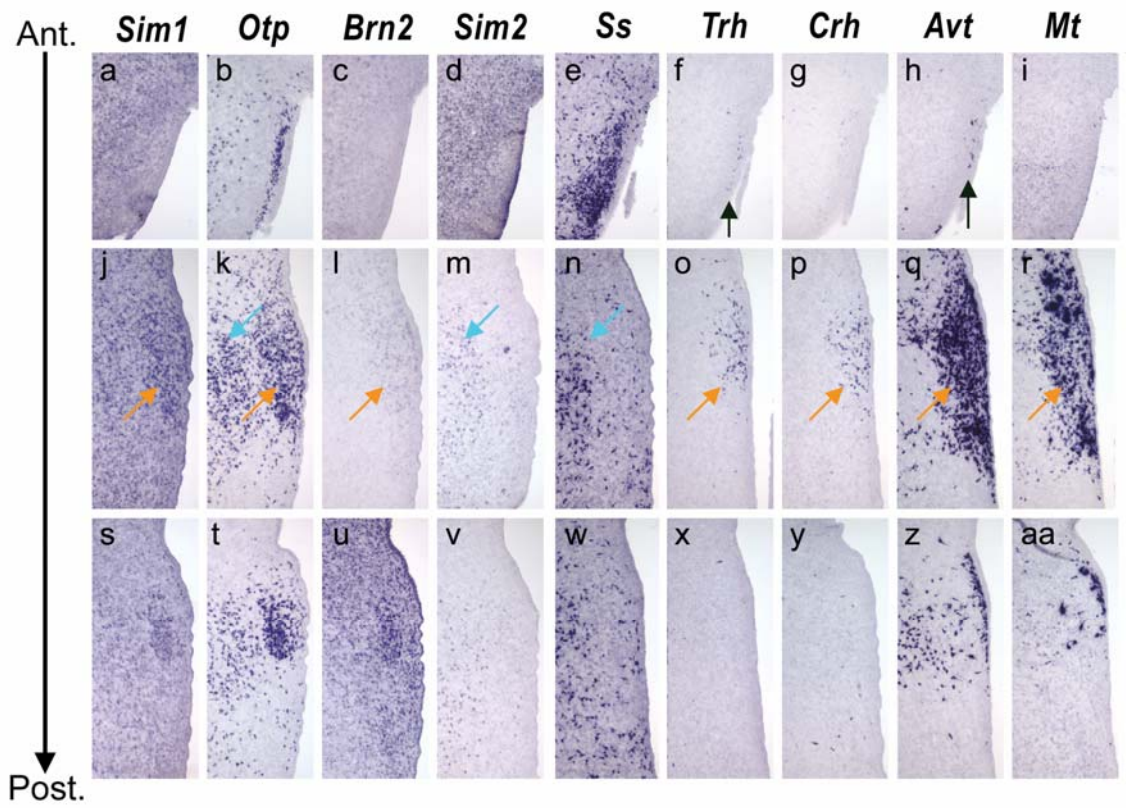


Figure 5.

Figure 5. Expression of transcription factors and markers of terminal differentiation in Hamburger and Hamilton stage (HH) 40 hypothalamus. a-aa: Comparison of *Sim1* (a, j, s), *Otp* (b, k, t), *Brn2* (c, l, u), *Sim2* (d, m, v), *Ss* (e, n, w), *Trh* (f, o, x), *Crh* (g, p, y), *Avt* (h, q, z), and *Mt* (i, r, aa) expression in the anterior hypothalamus of an HH40 chick embryo. One set of coronal adjacent sections was hybridized with *Sim1*, *Otp*, *Brn2*, and *Sim2* probes, whereas another set of adjacent sections was hybridized with *Sim1* (not shown) *Ss*, *Trh*, *Crh*, *Avt*, and *Mt* probes. Sections a-i correspond to the same level of the hypothalamus, located 350 and 700 μm anteriorly from the level of sections j-r and s-aa, respectively. Orange arrows indicate medial domains, and blue arrows lateral domains of expression.

CHAPITRE III: Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus.

Publié dans:

Developmental Biology, 298(1) :95-106, 2006

Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus.

Aurore Caqueret¹, Francine Boucher¹, Jacques L. Michaud^{1*}

¹Research Center, Hôpital Sainte-Justine, Montreal, Canada

*Correspondence: Jacques L. Michaud,

Research Center,

Hôpital Sainte-Justine,

3175 Côte Sainte-Catherine,

Montreal, Quebec,

Canada H3T 1C5

Keywords: *Sim1*; Hypothalamus; Development; Mice; Microarray; Transcription factor

Contribution :

J'ai participé, en compagnie de mon directeur de recherche Jacques L. Michaud, à la conception de toutes les expériences présentes dans cet article. J'ai réalisé l'ensemble des expériences dont découlent les résultats publiés dans cet article exceptées les énumérations suivantes. Les croisements de souris, leur génotypage ainsi que les injections intrapéritonéales de BrdU ont été réalisés par Mme Francine Boucher. Les dissections de l'hypothalamus antérieur chez les embryons de souris *Sim1^{+/+}* et *Sim1^{-/-}* ont été effectuées par le Dr Michaud et moi-même. Les amplifications linéaires d'ARN isolé des hypothalamus antérieurs et les hybridations sur micropuces ont été réalisées à la plateforme de micropuces du Centre d'Innovation Génome Québec à Montréal sous la supervision du Dr André Ponton. J'ai réalisé l'écriture de cet article en collaboration étroite avec mon directeur de recherche Jacques L. Michaud.

Abstract

The bHLH-PAS transcription factor SIM1 is required for the development of neurons of the anterior hypothalamus (AH). In order to dissect this developmental program, we compared gene expression in the AH of E12.5 *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{-/-} littermates using an oligonucleotide-based microarray. Our analysis identified 48 genes that were downregulated and 8 genes that were upregulated. We examined the expression pattern of 10 of the identified genes – *Cart*, *Cbln1*, *Alcam*, *Unc-13c*, *Rgs4*, *Lnx4*, *Irx3*, *Sax1*, *Ldb2* and *Neurod6* – by *in situ* hybridization in E12.5 embryos. All of these genes are expressed in domains that are contained within that of *Sim1* and their expression is changed in *Sim1*^{-/-} embryos as predicted by the microarray analysis. Classical dating studies have established that the hypothalamus follows an “outside-in” pattern of neurogenesis, with neurons of the lateral hypothalamus being born before the medial ones. Analysis of the genes identified in this microarray study showed that the developing AH is characterized by different layers of gene expression that most likely correspond to distinct waves of neurogenesis. In addition, our analysis suggests that *Sim1* function is required for the production or the survival of postmitotic neurons as well as for correct positioning of AH neurons.

Introduction

The anterior hypothalamus (AH) is composed of small nuclei interspaced between less defined regions. A great body of work involving physiological and genetic studies has assigned specific functions to these nuclei and regions. In particular, much attention has been paid to the paraventricular (PVN) and supraoptic nuclei (SON), which play a major role in the regulation of pituitary hormone secretion. In contrast, little is known about how neurons of the AH are specified and wired. Recently, a cascade of transcription factors has been shown to control the differentiation of several group of neurons located in the dorsal aspect of the AH in mice (Caqueret, A. et al. 2005a). The bHLH-PAS transcription factor SIM1 and its dimerizing partner ARNT2 are required for the differentiation of: (1) virtually all neurons of the PVN and SON, including those producing TRH, CRH, OT and AVP; (2) SS parvocellular neurons of the anterior periventricular nucleus, which is located anterior to the PVN; and (3) other populations of hypothalamic TRH neurons found in lateral areas and the preoptic region (Michaud, J. L. et al. 1998, Michaud, J. L. et al. 2000, Hosoya, T. et al. 2001 and Keith, B. et al. 2001).

The homeodomain-containing OTP acts in parallel with SIM1:ARNT2 for the differentiation of the same cell types (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). SIM1:ARNT2 and OTP control the differentiation of two populations of neurons through distinct pathways. First, they both act upstream to maintain the expression of the POU-domain *BRN2*, which, in turn, is required for the differentiation of CRH-, AVP- and OT-producing cells of the PVN/SON (Nakai, S. et al. 1995; Schonemann, M. D. et al. 1995). Second, SIM1:ARNT2 and OTP are required for *Sim2* expression in the developing hypothalamus (Schonemann, M. D. et al. 1995; Nakai, S. et al. 1995). In the absence of *Sim2*, a majority of SS cells of the anterior periventricular nuclei and of TRH cells of the PVN, lateral areas and preoptic region do not develop (Goshu, E. et al. 2004). These studies have also provided some evidence that the different PVN/SON cell types have distinct spatial origins since *Sim2* is expressed in a domain more anterior than that of *Brn2* during hypothalamus development (Goshu, E. et al. 2004). Of note, a group of neurons leave the presumptive PVN region around E14.5

and migrate at the surface of the brain to form the SON. A scheme representing the different positions of the nuclei mentioned above is shown in Fig. 1A.

Because it is required for the development of several groups of neurons of the AH, *Sim1* represents an interesting reference point to further dissect the developmental program of this region. In order to characterize this program in more detail, we compared the transcriptomes of the AH of E12.5 *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{-/-} embryos and identified several downstream genes. Classical dating studies have established that the hypothalamus follows an “outside-in” pattern of neurogenesis, with neurons of the lateral hypothalamus being born before the medial ones (Altman, J. and Bayer, S. A. 1978; Markakis, E. A. 2002). Analyzing the expression of genes identified in our transcriptome study, we found that the developing hypothalamus is characterized by different layers of gene expression that most likely correspond to distinct waves of neurogenesis. In addition, our analysis suggests that *Sim1* function is required for the proliferation or survival of progenitors as well as for correct positioning of PVN neurons.

Methods

Mice and embryos

Genotyping of the *Sim1*⁻ and *Sim1*^{flz} alleles has been previously described (Michaud, J. L. et al. 1998; Marion, J-F. et al. 2005). Mice were maintained on a C57BL6/129Sv mixed background. For dissection of the AH region, heads of E12.5 embryos were first split on the midline and the two halves of the brain were isolated from the rest of the head. The AH region was isolated from these bisected brains with three cuts, as shown in Fig. 1. The two AH samples from a single embryo were pooled, frozen on dry ice and conserved at -80°C .

Microarray studies

For microarray studies, each *Sim1*^{-/-} AH sample was paired with a *Sim1*^{+/+} AH sample from the same litter. Total RNA was isolated with the Picopure RNA Isolation kit (Arcturus). Quality of RNA preparation was verified using an Agilent Bioanalyzer 2100. Two cycles of linear amplification were performed using the GeneChip Two-Cycle Target Labeling kit (Affymetrix). The generation of cDNA, production of labeled cRNA and hybridization to GeneChip arrays were all performed on the same day, according to standard protocols provided by the manufacturer (Affymetrix). The analysis of microarray data was performed using the MAS5 – mean scale normalized – method. This method involves background correction, calculation of a detection call using the mismatch probe cells and a one-step Tukey's Biweight algorithm to average the probe values. The probe set intensities are then normalized by equating the mean intensity across all genes of each array. The NetAffx Centre database (Affymetrix) was used to correlate our results with the microarray genes annotations.

BrdU labeling, TUNEL assay, LacZ staining and in situ hybridization

BrdU (50 µg/g; Sigma) was administered intraperitoneally to E10.5, E11.5 or E12.5 pregnant mice. Embryos were collected at E12.5, fixed in a solution containing 60% methanol, 30% chloroform and 10% acetic acid, embedded in paraffin and sectioned at 4 µM. Detection of BrdU incorporation by immunohistochemistry was performed as described by the manufacturer (Zymed Laboratories Inc). Quantification of BrdU incorporation was performed by measuring the total intensity of the signals in the *Sim1* domain of expression on every 4 sections, using the software Image Pro. The *Sim1* domain was revealed by in situ hybridization performed on adjacent sections. Statistical analysis was performed with the unpaired *t* test. For TUNEL assay, E11.0, E12.0 or E14.5 embryos were fixed in 3.7% formaldehyde, embedded in paraffin and sectioned at 6 µM. Apoptotic cells were detected using the Neuro Tacs II kit (R&D systems). LacZ staining was performed as previously described (Marion, J-F. et al. 2005).

For *in situ* hybridization, embryos were fixed in Carnoy's fluid, embedded in paraffin and sectioned at 6 µM. In situ hybridization was performed as previously

described (Fan, C-M. et al. 1996). Each comparison of markers on adjacent sections was done at least three times. The *Sim1* probe used in this study corresponds to a 1.2-kb sequence located 3' to the disrupted region, thus allowing hybridization to both the wild-type and mutant transcripts (Michaud, J. L. et al. 1998). The *Brn2* and *Trh* probes were previously described (Michaud, J. L. et al. 1998). The *Nkx2.2* probe was a generous gift from J.L. Rubenstein (UCSF, California). The *Otp*, *Lnx4*, *Rgs4*, *Neurod6*, *Ldb2*, *Cart*, *Cbln1*, *Irx3*, *Sax1* and *Unc13c* probes were generated by RT-PCR, using total RNA isolated from E18.5 mouse brains. Primer sequences were deduced from mouse mRNA sequences deposited in Genbank and are available upon request. The *Alcam* probe was purchased from ATCC bioproducts (MGC27910 clone).

Results

Gene expression profiling of the developing anterior hypothalamus

This study is centered on the region of the AH that is defined by the domain of *Sim1* expression; it should be underlined that *Sim1* is not expressed in the most ventral aspect of the AH. Postmitotic cells of the AH are generated between E10.5 and E12.5 in mice (Karim, M. A. and Sloper, J. C. 1980). In the developing AH, *Sim1* expression appears to be restricted to the mantle layer, starting at E10.5, when the first newly born cells arise (data not shown). In the absence of *Sim1*, these cells are generated, as shown by the expression of the *Sim1* mutant transcript as well as of *Brn4*, *Nkx2.2*, *Uncx4.1* and *Otp* in the mantle layer of E12.5 *Sim1*^{-/-} embryos, but do not terminally differentiate (Michaud, J. L. et al. 1998; Acampora, D. et al. 1999) (data not shown). Dual labeling studies have previously shown that *Brn2* and *Brn4* are co-expressed in prospective PVN neurons (Schonemann, M. D. et al. 1995). The fact that the expression of *Brn2*, but not that of *Brn4*, is decreased in E12.5 *Sim1* mutants suggests that *Sim1* is specifically required for the maintenance of *Brn2* expression.

In order to further dissect the function of *Sim1* during development of the hypothalamus, we compared gene expression in the AH of E12.5 *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{-/-} littermate embryos. This stage precedes the phase of terminal differentiation of

PVN/SON neurons, which is completed between E13.5 and E15.5 (Michaud, J. L. et al. 1998). As mentioned above, *Sim1* functions in the AH of E12.5 embryos, at least in their PVN/SON prospective neurons. We developed a microdissection procedure that permits the isolation of the AH region at E12.5, 80% of which being occupied by the *Sim1* expressing domain (Fig. 1B). AH RNAs were analyzed using the commercial oligonucleotide-based MOE430 2.0 array, which is composed of 45,000 probe sets representing 39,000 transcripts. We compared the transcriptome of three *Sim1*^{+/+} embryos with that of three *Sim1*^{-/-} littermates. Starting with transcripts that were detected as “present” in the three experiments in at least one of the two *Sim1* genotypes, we selected genes using the following criteria: (1) an unambiguous hybridization signal and a normalized expression level of 200 or more in all the control samples, as determined by the MAS5 method; and (2) a change of expression of at least two-fold with a *P* value of < 0.05. For one *Sim1*^{-/-} sample, the relative expression level for genes meeting these criteria was intermediate between those of *Sim1*^{+/+} samples and of the other *Sim1*^{-/-} samples. DNAs corresponding to the six samples were genotyped again using this time Southern blot analysis instead of PCR. We confirmed all the genotypes except that of the *Sim1*^{-/-} sample with the intermediate values, which was actually heterozygous. This sample and its paired *Sim1*^{+/+} sample were discarded, and the analysis was performed with the other four samples. A set of 63 probes fulfilled the criteria, representing 32 known and 24 unknown genes. The expression of 48 and 8 genes was found to be decreased or increased, respectively, in the AH of *Sim1*^{-/-} embryos compared to that of littermate controls (Fig. 1C; Table 1 and Table 2).

The expression of three genes, *Sim1*, *Trh* and *Sim2*, previously shown to be decreased in the AH of E12.5 *Sim1*^{-/-} embryos, was found to be downregulated in our microarray screen, providing some validation of the results (Fig. 1C; Table 1 and Table 2). In order to further validate the analysis, we used *in situ* hybridization to compare the expression of 10 other genes identified through the screen in *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{-/-} embryos. These genes were selected because their expression appears to be more sensitive to *Sim1* than the other genes and/or because they code for potential regulators of hypothalamus development or function. The expression of all downregulated genes –

Ln timer, *Rgs4*, *Unc13c*, *Alcam*, *Cart*, *Cbln1*, *Ldb2*, *Neurod6* – that we selected for validation was detectable in the AH of E12.5 *Sim1*^{+/+} embryos, in domains that were contained within that of *Sim1*, and was decreased in *Sim1*^{-/-} embryos (Fig. 2). Two other genes – *Irx3* and *Sax1* – that we selected for validation were found to be upregulated in our microarray analysis (Fig. 2). The expression of these genes was not detectable in the hypothalamus of E12.5 *Sim1*^{+/+} embryos but was increased in mutant embryos. Altogether, these studies provide validation of the results of the screen.

Molecular characterization of the developing anterior hypothalamus

In order to correlate gene expression in the embryonic AH with the subsequent development of its different regions, we compared the expression of 15 markers, including some of those generated in this microarray screen as well as others previously characterized. We found that most of these markers can be classified into three main groups based on the mediolateral extent of their expression in the mantle layer of E12.5 AH: (1) *Brn2*, *Nkx2.2* and *Brn4* are expressed in medial domains, immediately adjacent to the ventricular layer; (2) *Rgs4*, *Sim2*, *Cbln1*, *Cart*, *Alcam*, *Unc13c*, *Ldb2* and *Trh* are expressed in lateral domains that do not overlap, or show limited overlap, with the medial ones; and (3) *Sim1*, *Otp*, *Uncx4.1* and *Ln timer* are expressed in domains that include both the medial and lateral ones, extending from the ventricular layer to the surface of the brain (Fig. 2 and Fig. 5; and data not shown).

Several studies have shown that neurons of the hypothalamus are generated in an “outside-in” fashion with neurons born earlier, occupying a more lateral position in the mantle zone (Altman, J. and Bayer, S. A. 1978; Markakis, E. A. 2002). However, the relationship between the identity of these cells and their mediolateral position has not yet been formally studied. We took advantage of the markers identified in our microarray study to explore this question by examining their expression at different stages of development. At E11.0, shortly after the onset of *Sim1* expression in the hypothalamus, layers of gene expression can be observed in the mantle zone (Fig. 3). The expression domains of *Sim1*, *Rgs4*, *Sim2*, *Cart* and *Cbln1* all extend to the lateral border of the neural tube but show distinct medial boundaries (Figs. 3A–C, E–G, H). At least three

patterns can be distinguished: the *Sim1* expression domain has the most medial boundary followed by that of *Rgs4*, whereas *Sim2*, *Cart* and *Cbln1* expression occupies a smaller and more lateral domain. In contrast, *Brn2* expression is detectable in the ventricular zone and extends into the mantle zone up to the medial boundary of the *Rgs4* domain (Figs. 3I–K, H). In other words, *Brn2* and *Rgs4* domains appear complementary. Of note, *Trh* and *Nkx2.2* are not expressed at this stage in the anterior hypothalamus.

At E11.5, a similar pattern of expression can be observed in the mantle zone of the hypothalamus. At least four lateral domains, all extending to the surface of the neural tube, can be defined by the respective expression of *Sim1*, *Rgs4*, *Cbln1* and *Cart/Sim2/Trh* (Fig. 4). At the anterior level of the *Sim1* domain of expression in E11.5 embryos, *Brn2* and *Rgs4* expression is complementary (Figs. 4O, S–U). Posteriorly, there is a decrease of *Brn2* expression in the most lateral aspect of the neural tube, where *Rgs4* is expressed, but the domains of expression of these two genes show some overlap more medially (Figs. 4K, V, W, Y). *Nkx2.2* is also expressed medially in a domain that appears complementary to that of *Rgs4* (Figs. 4K, X, Z).

At E12.5, the expression of *Cart*, *Cbln1* and *Trh* in the most anterior region of the hypothalamus extends more medially than what is observed at E11.5, the first two markers overlapping almost entirely with the domain of *Rgs4* expression while the latter one extends more medially than *Trh* (Figs. 5C–F). As illustrated in Fig. 5, the markers studied define at least 4 layers of expression in the mantle zone. Of note, *Brn2* and *Nkx2.2* are not expressed in the mantle zone of the anterior AH. Similar patterns of expression are found posteriorly, with a few exceptions: (1) *Brn2* and *Nkx2.2* are expressed in the posterior AH; their domains are restricted to the medial aspect of the neural tube, overlapping minimally with *Rgs4* (Figs. 5S, T, U); the *Nkx2.2* domain occupies a subset of that of *Brn2*; (2) *Cart* is not expressed in this region of the hypothalamus (Fig. 5H). At E13.5, the markers studied showed similar patterns of expression (Figs. 5Y–AC; not shown). Overall, these studies revealed a dynamic pattern of layered expression during AH development.

Waves of neurogenesis in the developing anterior hypothalamus

In order to correlate the *Sim1* expression pattern with the “outside-in” pattern of neurogenesis that has been described in rats, BrdU was administered to E10.5 and E11.5 pregnant wild-type mice and embryos were collected at E12.5. Staining with BrdU antibody was compared with the distribution of the *Sim1* transcript. Incorporation of BrdU at E10.5 resulted in labeling of cells that were found in a narrow domain in the most lateral aspect of the mantle layer whereas incorporation at E11.5 generated labeled cells in a more median domain (Figs. 6A–D). These observations thus confirmed the existence of an “outside-in” pattern of neurogenesis in the region of the AH in which *Sim1* is expressed.

The *Sim1* mutant transcript is detectable in a narrower domain than that of the wild-type transcript (for example, compare Figs. 2Q and X). A similar decrease of the *Sim1*-expressing domain was correlated with a reduction of BrdU incorporation in *Otp* mutant embryos (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). In order to explore the possibility that loss of *Sim1* is associated with the same abnormality, we compared the patterns of BrdU incorporation in *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{-/-} embryos. The number of cells labeled at E10.5 or E11.5 was reduced by 30% in *Sim1*^{-/-} embryos compared to controls (Figs. 6E–J; $P < 0.02$; $n = 3$ for each genotype and for each stage). The number of labeled cells in the cortex of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{-/-} embryos was not different (data not shown). In order to determine whether this reduction of cell number is caused by increased apoptosis, we performed TUNEL assay at E11.0, E12.0 and E14.5. We did not observe any increase of apoptotic cells in the AH region of *Sim1*^{-/-} embryos at these stages (data not shown). Although we cannot rule out that other forms of cell death are responsible for the reduction of cell number in *Sim1*^{-/-} AH, the decrease of BrdU incorporation may be explained by reduced cell proliferation. While *Sim1* does not appear to be expressed in the VZ, at least not on the apical side, cells that have incorporated BrdU after a short pulse of 1 h are contained within the *Sim1* expression domain of E12.5 embryos (Figs. 6K, L). This observation thus raises the possibility that *Sim1* is not only expressed in the mantle zone but also in a subset of progenitors located in the basal aspect of the ventricular zone. Thus, one possible explanation for the

decrease of postmitotic cells in mutant embryos would be that *Sim1* regulates the proliferation of basal progenitors.

Fate of medial and lateral domains of the anterior hypothalamus in $Sim1^{+/+}$ and $Sim1^{-/-}$ embryos

In order to determine how the medial and lateral domains of expression evolve during development, we next performed marker analysis at later embryonic stages. At E15.5, *Sim1*, *Brn2* and *Nkx2.2* are expressed in a domain immediately adjacent to the third ventricle, which corresponds to the PVN (Figs. 7B–D, L–N). Along with the knowledge of *Brn2* function in the developing AH, these results strongly suggest that that *Sim1*, *Brn2* and *Nkx2.2* expression in the medial layer of the E12.5 AH defines the prospective PVN domain. Similarly, genes such as *Sim2*, *Trh*, *Cbln1* and *Rgs4*, which expression is restricted to the lateral AH at early stages, continue to be expressed at later stages in various domains of the lateral AH (Figs. 7W–Y and data not shown). Interestingly, gene expression continues to show dynamic patterns during these later stages. For instance, although *Sim2*, *Trh*, *Cbln1* and *Rgs4* expression is restricted to the lateral AH in E12.5 embryos, expression of these genes becomes detectable in the prospective PVN as early as at E14.5 (Goshu, E. et al. 2004; Figs. 7W–Y).

We have previously reported that the expression of the *Sim1* mutant transcript is dramatically decreased in the PVN of E15.5 *Sim1^{-/-}* embryos, suggesting either that these cells die or change fate (Michaud, J. L. et al. 1998). TUNEL analysis did not reveal increased cell death in the AH region at E14.5 (data not shown). In order to gain insight into the fate of *Sim1* expressing cells in these mutants, we took advantage of a new mutant allele of *Sim1* (*Sim1^{lacZ}*) that we have recently generated by introducing a *tau-lacZ* fusion gene in the first coding exon (Marion, J-F. et al. 2005). We hypothesized that the production of lacZ would allow us to track *Sim1* mutant cells for a longer period of time than the *Sim1* transcript. We first compared the expression of *Sim1^{lacZ}* transcripts in E15.5 *Sim1^{+/+}* and *Sim1^{-/-}* embryos using probes directed either against *lacZ* or *Sim1* coding sequence. Whereas these two probes detect robust expression of the *Sim1^{lacZ}* transcript in the AH of *Sim1^{-/-}* E12.5 embryos, severe reduction of its expression was

found in the PVN and SON at E15.5 (Figs. 7B, F, L, P, J, T) (Marion, J-F. et al. 2005). In place, the *Sim1^{tlz}* transcript was detectable in a domain located midway between the third ventricle and the surface of the brain (Figs. 7F, P, J, T). A similar pattern of expression was observed with an *Otp* probe (Figs. 7E, I, O, S). β -galactosidase staining confirmed the decrease of *Sim1* mutant cells in the prospective PVN/SON and the ectopic accumulation of cells laterally (Figs. 7U, V). *Brn2* and *Nkx2.2* expression is dramatically decreased in the AH of E15.5 *Sim1* mutant embryos, except in a subset of cells located in a region corresponding to the lateral aspect of the prospective PVN (Figs. 7Q, R). Although it is possible that the PVN differentiation program was initiated in these cells, they do not appear to undergo terminal differentiation since *Avp*, *Crh* and *Ot* are never expressed in this region of the AH in *Sim1^{-/-}* embryos (Michaud, J. L. et al. 1998). Altogether, these observations indicate that *Sim1* is required for the correct positioning of PVN/SON cells.

Discussion

The hypothalamus contains neurons that are critical regulators of several physiological processes such as the homeostatic control of food intake and blood pressure. Recent studies indicate that understanding the development of the hypothalamus has the potential of shedding light on these physiological processes (Caqueret, A. et al. 2005a). For instance, subtle developmental defects affecting the number of hypothalamic cells, their differentiation or their axonal projections can cause metabolic and physiological disorders. Moreover, pathways that control neuronal differentiation, especially at the later stages, can be maintained in mature cells for the regulation of physiological effectors, like hormones or neurotransmitters. Finally, neurogenesis appears to be required in the adult hypothalamus for the regulation of energy balance (Kokoeva, M. V. et al. 2005). An immediate illustration of these concepts is provided by studies done on *Sim1*. Whereas *Sim1^{-/-}* mice die shortly after birth, presumably because of the hypothalamic developmental defects, *Sim1^{+/-}* mice survive and become obese (Michaud, J. L. et al. 2001; Holder, J. L. et al. 2004). *Sim1* haploinsufficiency appears to cause obesity by disrupting hypothalamic function through a mechanism currently under investigation.

In this study, we used *Sim1* as a reference point to dissect the developmental program of the AH and identified several genes that act downstream of *Sim1* in the embryonic hypothalamus. Some of these genes are associated with the program of terminal differentiation. These include *Trh*, *Cart* and *Cbln1*, which code for small peptides. As shown by these studies, these genes represent useful tools for mapping cell types during AH development. Other genes identified in the screen have the potential of acting as regulators of developmental processes. These include *Irx3* and *Sax1*, which code for homeodomain transcription factors, and *Ln timer4*, which is homologous to a ubiquitin ligase involved in the regulation of neurogenesis (Cohen, D. R. et al. 2000; Schubert, F. R. and Lumsden, A. 2005; Katoh, M. and Katoh, M. 2004). Interestingly, ectopic expression of *Irx3* and *Sax1* affects the development of the ventral thalamus and causes alterations of early axon scaffold at the midbrain–forebrain border, respectively, suggesting that their aberrant expression in the AH has the potential of disrupting its development (Kiecker, C. and Lumsden, A. 2004; Schubert, F. R. and Lumsden, A. 2005). The genes identified in our microarray analysis thus represent interesting targets for further dissection of the *Sim1* pathway.

Brn2 has previously been shown to act downstream of *Sim1* during AH development. However, our microarray analysis did not detect any decrease of its expression. While *Brn2* is expressed extensively in the developing AH, its expression is downregulated only in a subset of this region in E12.5 *Sim1*^{-/-} embryo. Thus, our microarray protocol does not appear to be sensitive enough to detect changes of expression that would occur only in a subset of the cells that express the gene of interest. It is noteworthy that another microarray study has identified downstream genes of *Sim1* by overexpressing it in cultured Neuro-2A cells (Liu, C. et al. 2003). Only one gene, *Ldb2*, was found in both studies, indicating that these microarray strategies are complementary.

Laminar organization of the developing anterior hypothalamus

Classical studies have established that neurons of the hypothalamus are generated in an “outside–in” fashion, with neurons born earlier occupying a more lateral position

in the mantle zone (Altman, J. and Bayer, S. A. 1978; Markakis, E. A. 2002). We have found a correlation between these waves of neurogenesis and the layered expression of markers identified in our screen and in previous studies. Our study suggests that the developing AH can be divided into two main domains along the mediolateral axis of the mantle layer. The medial domain, identifiable by the co-expression of *Sim1* and *Brn2* at E12.5, gives rise to the PVN/SON, whereas the lateral domain, defined by the expression of *Rgs4*, gives rise to a heterogeneous population of neurons. We have observed layers of expression within this lateral domain. The production of these layers could involve two processes. First, the expression of some markers, such as *Cart*, *Cbln1* and *Sim2*, progresses in an “outside-in” fashion during development, when compared to the expression of *Rgs4*, raising the possibility of a gradient of differentiation, with later born neurons starting to express these markers later in development than would early born neurons. Second, at least some of these layers of expression could reflect the existence of distinct populations of cells, each committed to a different fate. For instance, *Trh* expression defines a group of cells that can be distinguished from their more medial neighbors. Of note, consistent with the “outside-in” model of neurogenesis, neurons of the PVN do not complete terminal differentiation before E13.5–E15.5, whereas neurons of the lateral AH neurons are terminally differentiated as early as E11.5 as shown by the expression of *Trh* (Michaud, J. L. et al. 1998; Goshu, E. et al. 2004).

It should be underlined that *Brn2* and *Rgs4* expression patterns are not always strictly complementary in the developing AH. For instance, in the posterior AH of E11.5–E13.5 embryos, minimal overlap can be observed between these domains of expression. *Brn2* is expressed in AH progenitors. It is possible that all newly born AH neurons initially express *Brn2* and that their further differentiation results in its downregulation as well as the upregulation of *Rgs4* expression. Alternatively, the apparent overlap of these two domains could reflect some mixing of cells selectively expressing each of the markers. Finally, at later stages, after the end of the period of neurogenesis, it is possible that cells located in the medial domain start to express *Rgs4*, as suggested by our studies performed on E13.5 and E15.5 embryos.

In the chick, lineage studies with retroviral markers have revealed two phases of cell migration in the developing hypothalamus (Arnold-Aldea, S. A. and Cepko, C. L. 1996). The first phase, which occurs before day 10 of development, involves radial migration, whereas the second phase, of later onset, involves tangential cell migration. Our previous study of chick hypothalamic development has shown the existence, during this early phase, of two complementary domains in the mantle zone, a medial domain in which *Brn2* is expressed and a lateral domain recognizable by the expression of *Sim2* (Caqueret, A. et al. 2005b). Later on during development, this simple laminar organization of the anterior hypothalamus is lost. Similarly, the laminar expression of the markers studied here is most striking at E11.0–E11.5 in the early stages of mouse development, whereas, later on, expression domains become more complex in the AH. Thus, the laminar organization of the early hypothalamus in mouse embryo is most likely associated with the phase of radial cell migration, with subsequent reorganization of the populations of cells through tangential migration. This laminar organization is thus transient and should be distinguished from the lamination of the cortex, which is permanent. Furthermore, it should be underlined that our study has focused on a subset of the AH. Our conclusions do not necessarily apply to the other regions of the hypothalamus, even though the outside–in model appears to be a universal feature of hypothalamic development.

Convergent pathways for the development of the anterior hypothalamus

Sim1, *Arnt2* and *Otp* are co-expressed in the anterior hypothalamus of embryos and have been shown to be required for the development of the same cell types (Michaud, J. L. et al. 1998; Michaud, J. L. et al. 2000; Hosoya, T. et al. 2001; Keith, B. et al. 2001; Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). Our analysis indicates that these three genes are involved in the same processes at the cellular level. We have found that the number of cells that have incorporated BrdU between E10.5 and E12.5 is decreased in the anterior hypothalamus of *Sim1*^{-/-} embryos. The same abnormality has been observed in *Otp* mutant embryos (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). Interestingly, *Sim1* and *Otp* expression is not detected in the apical aspect of the neuroepithelium but their domain overlaps with cells located in the basal side of the neuroepithelium that have incorporated BrdU after a one-hour

pulse (Acampora, D. et al. 1999; Takahashi, T. et al. 1993; Porteus, M. H. et al. 1994; Calegari, F. et al. 2005). These observations thus raise the possibility that *Sim1* and *Otp* are not only expressed in the mantle zone but also in the basal ventricular zone.

Recent studies of cortical development have identified two groups of neuron-generating progenitors. Apical progenitors, located adjacent to the surface of the ventricle, were found to divide asymmetrically to generate another neuroepithelial cell and a neuron, whereas progenitors located in the basal neuroepithelium divide symmetrically to produce two neurons (Noctor, S. C. et al. 2004; Miyata, T. et al. 2004; Haubensak, W. et al. 2004). Although this process of “secondary neurogenesis” has been mainly studied in the developing telencephalon, some observations indicate that it could also occur in other regions of the brain, albeit possibly on a smaller scale (Haubensak, W. et al. 2004). Thus, one possibility would be that *Sim1* and *Otp* are expressed in basal neuron-producing progenitors like those identified in the developing telencephalon and act to regulate their cell cycle or their survival. Alternatively, it is possible that proliferation of progenitors is unaffected in these mutant embryos but that a proportion of neuronal precursors die rapidly after leaving the cell cycle in the absence of *Sim1* or *Otp*. We did not detect any increase of apoptosis nor massive necrosis in the developing hypothalamus of mutant embryos. However, other mechanisms of death could underlie the disappearance of these cells.

PVN development is characterized by the absence of important morphogenetic movements; postmitotic neurons that populate the PVN form a compact domain near the third ventricle. In contrast, we have found that prospective PVN cells leave the periventricular region in *Sim1*^{-/-} embryos and accumulate ectopically in a domain located midway between the ventricular lumen and the surface of the brain. Interestingly, abnormally migrating cells were also described in similar regions of *Arnt2* and *Otp* mutant embryos (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000; Michaud, J. L. et al., 2000). Therefore, *Sim1*, *Arnt2* and *Otp* are not only required for the differentiation of AH neurons but also for the production or survival of postmitotic cells

and for their correct positioning. SIM1 can physically interact with ARNT2, the latter presumably acting as the dimerizing partner of the former (Michaud, J. L. et al. 2000). In contrast, using a yeast two-hybrid assay, we failed to detect any interaction between SIM1 or ARNT2 and OTP (Yang, C. and Michaud, J. L. unpublished observations). Furthermore, *Sim1* and *Otp* do not regulate their respective expression (Acampora, D. et al. 1999). Our results nevertheless suggest that SIM1:ARNT2 and OTP function along convergent pathways, possibly by forming a complex through some interaction with other proteins.

Acknowledgments

We wish to thank André Ponton from the Genome Quebec Innovation Centre for his help with the microarray experiments. This work was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-15458) and from the Sick Kids Foundation (XG 05-051). JLM is a scientist of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

References:

- Acampora, D., Postiglione, M. P., Avantaggiato, V., Di Bonito, M., Vaccarino, F.M., Michaud, J. L. and Simeone, A. (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev.* 13: 2787–2800.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1978) Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 182: 945–971.
- Arnold-Aldea, S. A. And Cepko, C. L. (1996) Dispersion patterns of clonally related cells during development of the hypothalamus. *Dev. Biol.* 173: 148–161.
- Calegari, F., Haubensak, W., Haffner, C. and Huttner, W. B. (2005) Selective lengthening of the cell cycle in the neurogenic subpopulation of neural progenitor cells during mouse brain development. *J. Neurosci.* 25: 6533–6538.
- Caqueret, A., Yang, C., Duplan, S., Boucher, F. and Michaud, J. L. (2005a) Looking for trouble: a search for developmental defects of the hypothalamus. *Horm. Res.* 64: 222–230.
- Caqueret, A., Coumailleau, P. and Michaud, J. L. (2005b) Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo. *Dev. Dyn.* 233: 652–658.
- Cohen, D. R., Cheng, C. W., Cheng, S. H. and Hui, C. C. (2000) Expression of two novel mouse Iroquois homeobox genes during neurogenesis. *Mech. Dev.* 91: 317–321.
- Fan, C-M., Kuwana, E., Bulfone, A., Fletcher, C. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Crews, S., Martinez, S., Puellas, L., Rubenstein, J. L. R. and Tessier-Lavigne, M. (1996) Expression patterns of two murine homologs of *Drosophila* single-minded suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 1–16.

- Goshu, E., Jin, H., Lovejoy, J., Marion, J-F., Michaud, J. L. and Fan, C-M. (2004) Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol. Endocrinol.* 18: 1251–1262.
- Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W. and Huttner, W. B. (2004) Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 3196–3201.
- Holder, J. L. Jr., Zhang, L., Kublaoui, B. M., DiLeone, R. J., Oz, O. K., Bair, C. H., Lee, Y. H. and Zinn, A. R. (2004) Sim1 gene dosage modulates the homeostatic feeding response to increased dietary fat in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: E105–E113.
- Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawauchi, S., Ema, M., Yamamoto, M. and Fujii-Kuriyama, Y. (2001) Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes Cells* 6: 361–374.
- Karim, M. A. and Sloper, J. C. (1980) Histogenesis of the supraoptic and paraventricular neurosecretory cells of the mouse hypothalamus. *J. Anat.* 130: 341–347.
- Katoh, M. and Katoh, M. (2004) Identification and characterization of PDZRN3 and PDZRN4 genes in silico. *Int. J. Mol. Med.* 13: 607–613.
- Keith, B., Adelman, D. M., and Simon, M. C. (2001) Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 6692–6697.
- Kiecker, C. and Lumsden, A. (2004) Hedgehog signalling from the ZLI regulates diencephalic regional identity. *Nat. Neurosci.* 7: 1242–1249.
- Kokoeva, M. V., Yin, H. and Flier, J. S. (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310: 679–683.

- Liu, C., Goshu, E., Wells, A. and Fan, C-M. (2003) Identification of the downstream targets of SIM1 and ARNT2, a pair of transcription factors essential for neuroendocrine cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 278: 44857–44867.
- Marion, J-F., Yang, C., Caqueret, A., Boucher, F. and Michaud, J. L. (2005) *Sim1* and *Sim2* are required for the correct targeting of mammillary body axons. *Development* 132: 5527–5537.
- Markakis, E. A. (2002) Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* 23: 257–291.
- Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R. and Fan, C-M. (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 12: 3264–3275.
- Michaud, J. L., DeRossi, C., May, N. R., Holdener, B. C. and Fan, C-M. (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech. Dev.* 90: 253–261.
- Michaud, J. L., Boucher, F., Melnyk, A., Gauthier, F., Goshu, E., Levy, E., Mitchell, G. A., Himms-Hagen, J. and Fan, C-M. (2001) *Sim1* haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum. Mol. Genet.* 10: 1465–1473.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T. and Ogawa, M. (2004) Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development* 131: 3133–3145.
- Nakai, S., Kawano, H., Yudate, T., Nishi, M., Kuno, J., Nagata, A., Jishage, K., Hamada, H., Fujii, H. and Kawamura, K. (1995) The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev.* 9: 3109–3121.

- Noctor, S. C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L. and Kriegstein, A. R. (2004) Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* 7: 136–144.
- Porteus, M. H., Bulfone, A., Liu, J. K., Puellas, L., Lo, L. C. and Rubenstein, J. L. (1994) DLX-2, MASH-1, and MAP-2 expression and bromodeoxyuridine incorporation define molecularly distinct cell populations in the embryonic mouse forebrain. *J. Neurosci.* 14: 6370–6383.
- Schonemann, M. D., Ryan, A. K., McEvelly, R. J. and O'Connell, C. A. (1995) Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor BRN2. *Genes Dev.* 9: 3122–3135.
- Schubert, F. R. and Lumsden, A. (2005) Transcriptional control of early tract formation in the embryonic chick midbrain. *Development* 132: 1785–1793.
- Takahashi, T., Nowakowski, R. S., and Caviness, V. S. Jr. (1993) Cell cycle parameters and patterns of nuclear movement in the neocortical proliferative zone of the fetal mouse. *J. Neurosci.* 13: 820–833.
- Wang, W. and Lufkin, T. (2000) The murine *otp* homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev. Biol.* 227: 432–449.

Table 1. Decreased transcripts in the anterior hypothalamus of E12.5 *Sim1*^{-/-} mouse embryos.

Description	Genbank Acc. n°	Experiment 1		Experiment 2		Fold KO/ WT
		WT	KO	WT	KO	
Decreased Transcripts						
Thyrotropin releasing hormone	NM_009426	181	8	276	8	29.0
LIM domain binding 2	BB097063	203	43	251	12	8.0
Activated leukocyte cell adhesion molecule *	AV315205	604	119	543	72	6.0
Ligand-of-numb protein-X 4	AV174487	880	154	844	200	4.2
Unc-13 homolog C	BQ175902	556	126	456	112	4.2
Cocaine and amphetamine regulated transcript	NM_013732	1900	668	1582	197	4.0
Neurogenic differentiation 6	NM_009717	229	60	183	64	3.3
Regulator of G-protein signaling 4	NM_009062	2919	923	2546	926	3.0
Cerebellin 1 precursor protein *	AA016422	2482	924	2043	627	2.9
Retinoid X receptor gamma	NM_009107	503	178	387	133	2.9
Single minded 1	NM_011376	5082	2025	5162	1627	2.8
Myosin VIIA and Rab interacting protein	BB429683	605	247	621	200	2.7
Glutamate receptor ionotropic AMPA1 (alpha1)	BQ175316	423	194	475	154	2.6
RAR-related orphan receptor alpha	BI660199	228	74	256	123	2.5
Solute carrier family 35 member F3	BB427860	237	93	223	91	2.5
Hexokinase 2	NM_013820	1390	633	1527	560	2.4
Single minded 2	D633383	327	184	359	102	2.4
Leucine-rich repeat LGI family member 2	BM118120	773	286	602	291	2.4
Leucine rich repeats and calponin homology domain containing 1	BB755336	290	108	257	117	2.4
Transmembrane and coiled coil domains 3	BB771888	2721	1272	3165	1192	2.4
Early endosome antigen 1	AW556344	472	155	376	208	2.3
Neurexophilin 1	BB274960	530	230	516	245	2.2
Dihydropyrimidinase-like 2	BB481761	297	152	336	141	2.2
Discs large (Drosophila) homolog associated protein	BQ174338	398	196	361	174	2.1
Odd Oz/ten-m homolog 1	NM_011855	363	144	351	204	2.0
A kinase (PRKA) anchor protein 10	AK005325	463	278	570	284	2.0
Aortic preferentially expressed gene 1	NM_007463	680	324	614	322	2.0
Uncharacterised decreased transcripts						
	AW547688	223	78	185	32	3.7
	BB066943	698	196	796	287	3.1
	BB125269	812	304	1045	322	3.0
	BM203642	191	76	245	81	2.7
	BB353607	1394	485	1388	563	2.7
	BB220625	210	59	200	106	2.5
	BM195829	1394	485	1388	563	2.5
	BB525584	370	162	357	142	2.4
	BI080487	282	119	329	141	2.4
	BB328076	444	165	439	218	2.3
	BE948984	279	131	321	1351	2.3
	BB283427	203	97	250	103	2.3
	BE955100	326	139	300	140	2.3
	AK014675	1134	552	941	376	2.2
	BB076281	319	165	348	137	2.2
	AA940303	217	110	261	108	2.2
	BG064153	349	130	365	201	2.2
	BB303080	232	116	212	92	2.1
	BB174589	424	212	381	177	2.1
	AK013740	13025	6618	13500	6245	2.1
	BM122201	264	132	274	137	2.0

This table and Table 2 show expression data for 48 decreased transcripts and 8 increased transcripts among the 39000 transcripts represent on a the MOE430 2.0 array that met the following criteria: 1) an unambiguous hybridization signals and a normalized expression level of 200 or more in all the control samples, 2) a p-value of <0.05, 3) a change of expression of at least two-fold. The fold change is calculated as the ratio of knockout/wild type expression and represents the mean of the individual ratios for the two experiments. The asterisked gene names represent genes for which there is more than one probe with its expression level affected in the same way than the result shown in the table. The genes selected to validate the microarray results are in bold.

Table 2. Increased transcripts in the anterior hypothalamus of E12.5 *Sim1*^{-/-} mouse embryos.

Description	Genbank Acc. n°	Experiment 1		Experiment 2		Fold KO/ WT
		WT	KO	WT	KO	
Increased transcripts						
NK1 transcription factor related locus 2	NM_009123	16	506	8	440	39.3
Fructose biphosphatase 1	NM_019395	14	423	75	323	8.3
Iroquois related homeobox 3	NM_008393	61	280	128	273	2.9
Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K	AA175187	1495	3141	1465	2828	2.0
Fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1	BC026949	149	250	97	245	2.0
Uncharacterised increased transcripts						
	AV381093	42	215	68	199	3.8
	BB465134	223	802	293	634	2.8
	AK018605	139	321	145	265	2.1

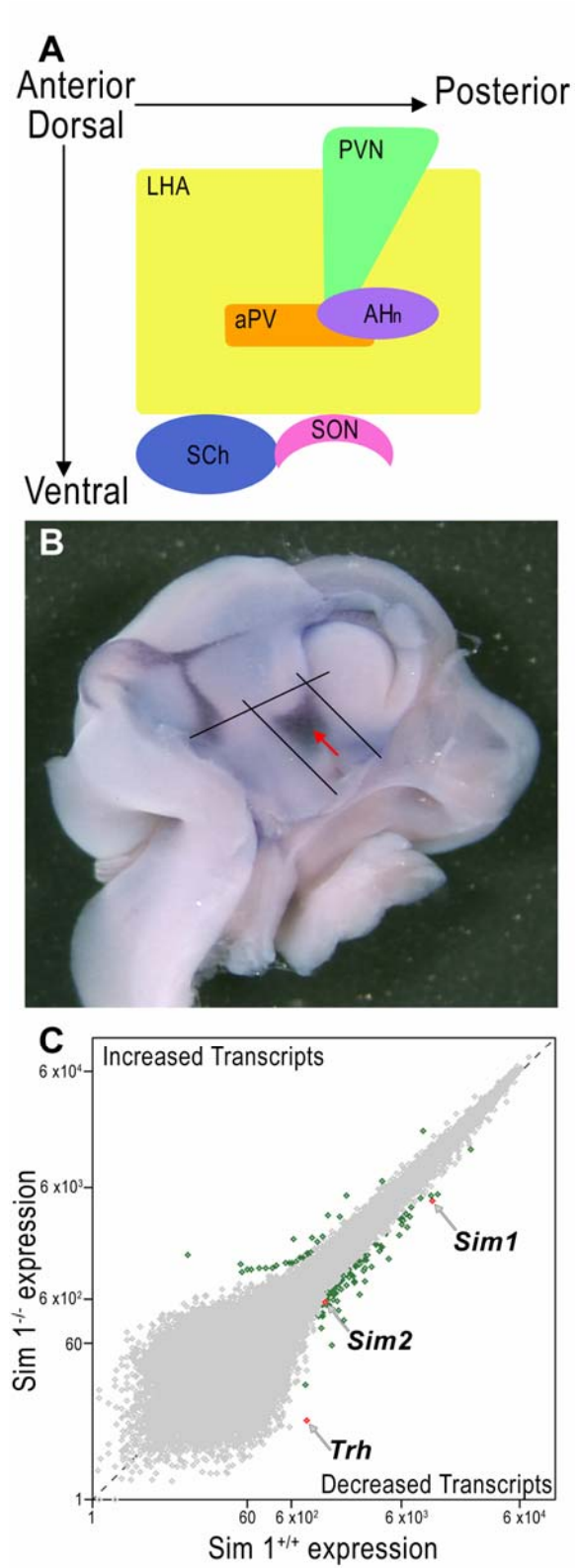


Figure 1.

Figure 1. Microarray analysis of the anterior hypothalamus of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{-/-} embryos. (A) Scheme representing major cell groups of the anterior hypothalamus. AHn: anterior hypothalamic nucleus; aPV: anterior periventricular nucleus; LHA: lateral hypothalamic area; PVN: paraventricular nucleus, SCh: suprachiasmatic nucleus; SON: supraoptic nucleus. (B) Landmarks used for the dissection of the anterior hypothalamus of E12.5 embryos. Whole-mount in situ hybridization showing the expression domain of *Sim1* (red arrow) in a bisected head of an E12.5 *Sim1*^{+/-} embryo. The prospective PVN occupies the dorsal and posterior quadrant of this domain. The black lines indicate the passages of the knife. (C) Microarray analysis of the transcriptomes of the AH of E12.5 *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{-/-} embryos. Normalized scatterplot representing the hybridization signal for the 39,000 transcripts present on the MOE 430 2.0 array comparing the results for two *Sim1*^{+/+} and two *Sim1*^{-/-} littermate embryos. Each plotted point corresponds to a probe set. The green plotted points represent probes for which there is at least a twofold change in expression. Our analysis identified 48 genes that were downregulated and 8 genes that were upregulated. The three red highlighted plotted points correspond to *Sim1*, *Sim2* and *Trh*, three genes which expression was expected to be downregulated in the AH of *Sim1* mutant embryos.

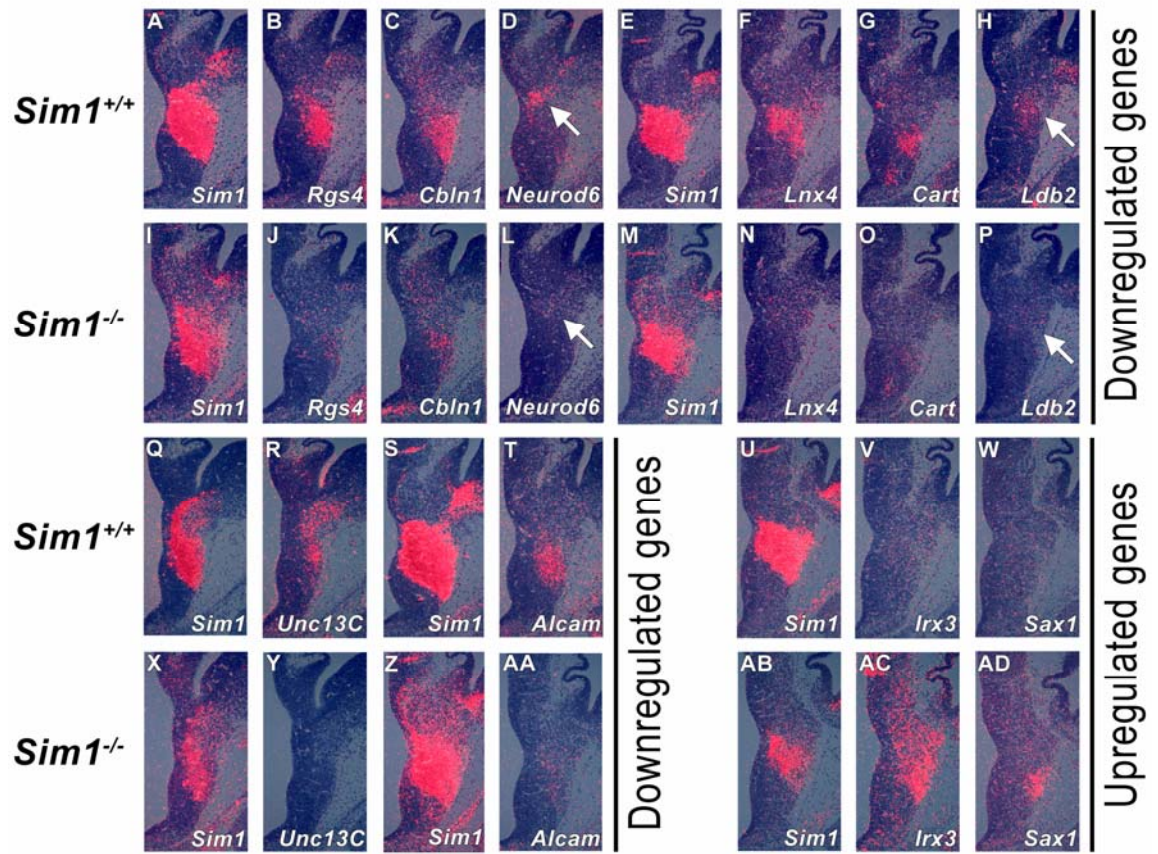


Figure 2.

Figure 2. Validation of microarray results using *in situ* hybridization. Coronal sections through the AH of E12.5 *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{-/-} embryos were hybridized either with a *Sim1* (A, E, I, M, Q, S, U, X, Z, AB), *Rgs4* (B, J), *Cbln1* (C, K), *Neurod6* (D, L), *Ln timer4* (F, N), *Cart* (G, O), *Ldb2* (H, P), *Unc13C* (R, Y), *Alcam* (T, AA), *Irx3* (V, AC) or *Sax1* (W, AD) probe. (A–D), (E–H) (Q–R), (S–T) and (U–W) represent different sets of adjacent sections of wild-type embryos, whereas (I–L), (M–P), (X–Y), (Z–AA) and (AB–AD) represent different sets of adjacent sections of *Sim1*^{-/-} littermates. The white arrows show the expression domain of *Neurod6* and *Ldb2*. All of these genes are expressed in domains that are contained within that of *Sim1*, and their expression is changed in *Sim1*^{-/-} embryos as predicted by the microarray analysis.

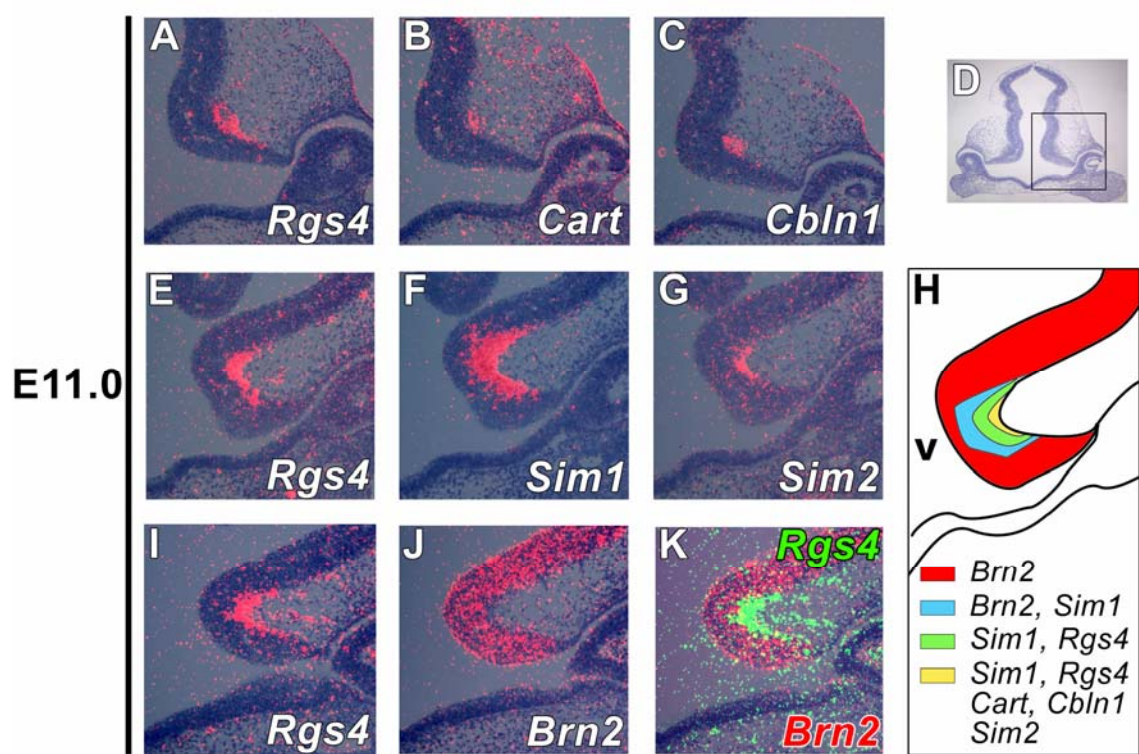


Figure 3.

Figure 3. Lamination of the anterior hypothalamus at E11.0. Coronal sections through the AH of E11.0 *Sim1*^{+/+} embryos were hybridized with *Rgs4* (A, E, I), *Cart* (B), *Cbln1* (C), *Sim1* (F), *Sim2* (G) and *Brn2* (J) probes. (A–C), (E–G) and (I–K) represent three sets of adjacent sections. (D) represents a coronal section through the forebrain; the box corresponds to the region shown in panels A–C, E–G and I–K. As shown in panel K, *Brn2* (red signal) and *Rgs4* (green signal) occupy complementary domains. At least four layers of gene expression can be defined as shown in the schematic representation (H). The letter “V” in the scheme represents the position of the third ventricle.

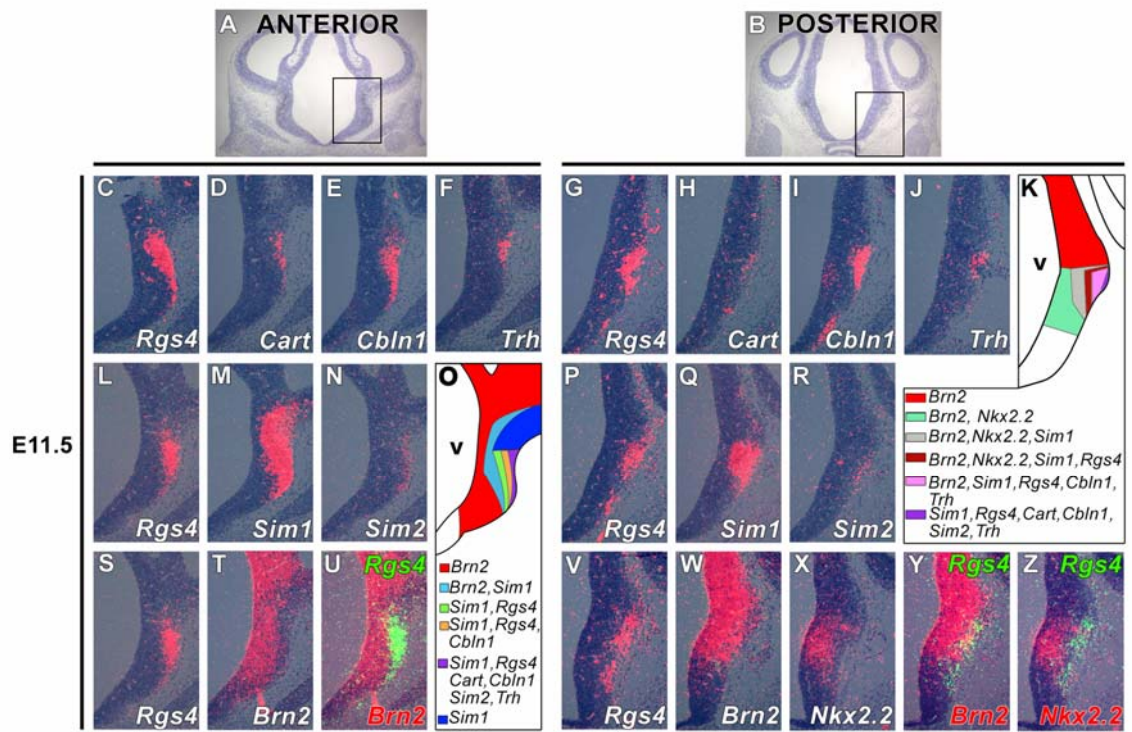


Figure 4.

Figure 4. Lamination of the anterior hypothalamus at E11.5. (A) represents a coronal section through the anterior aspect of the AH of E11.5 *Sim1*^{+/+} embryos; the box corresponds to the region shown in panels C–F, L–N and S–U. (B) represents a coronal section through the posterior aspect of the AH of E11.5 *Sim1*^{+/+} embryos; the box corresponds to the region shown in panels G–J, P–R and V–X. Sections were hybridized with *Rgs4* (C, G, L, P, S, V), *Cart* (D, H), *Cbln1* (E, I), *Trh* (F, J), *Sim1* (M, Q), *Sim2* (N, R), *Brn2* (T, W) and *Nkx2.2* (X) probes. (C–F), (G–J), (L–N), (P–R), (S–U) and (V–X) represent different sets of adjacent sections. *Brn2* (red signal) and *Rgs4* (green signal) occupy complementary domains in the anterior part (U) of the anterior hypothalamus, whereas minimal overlap between *Brn2* and *Rgs4* expression pattern is observed in the posterior AH (Y). *Nkx2.2* (red signal) and *Rgs4* (green signal) expression also defines two complementary domains in the posterior AH (Z). The expression patterns in the anterior and posterior AH of the markers studied are summarized, respectively, in the schemes shown in panels O and K. The letter “V” in the schemes represents the position of the third ventricle.

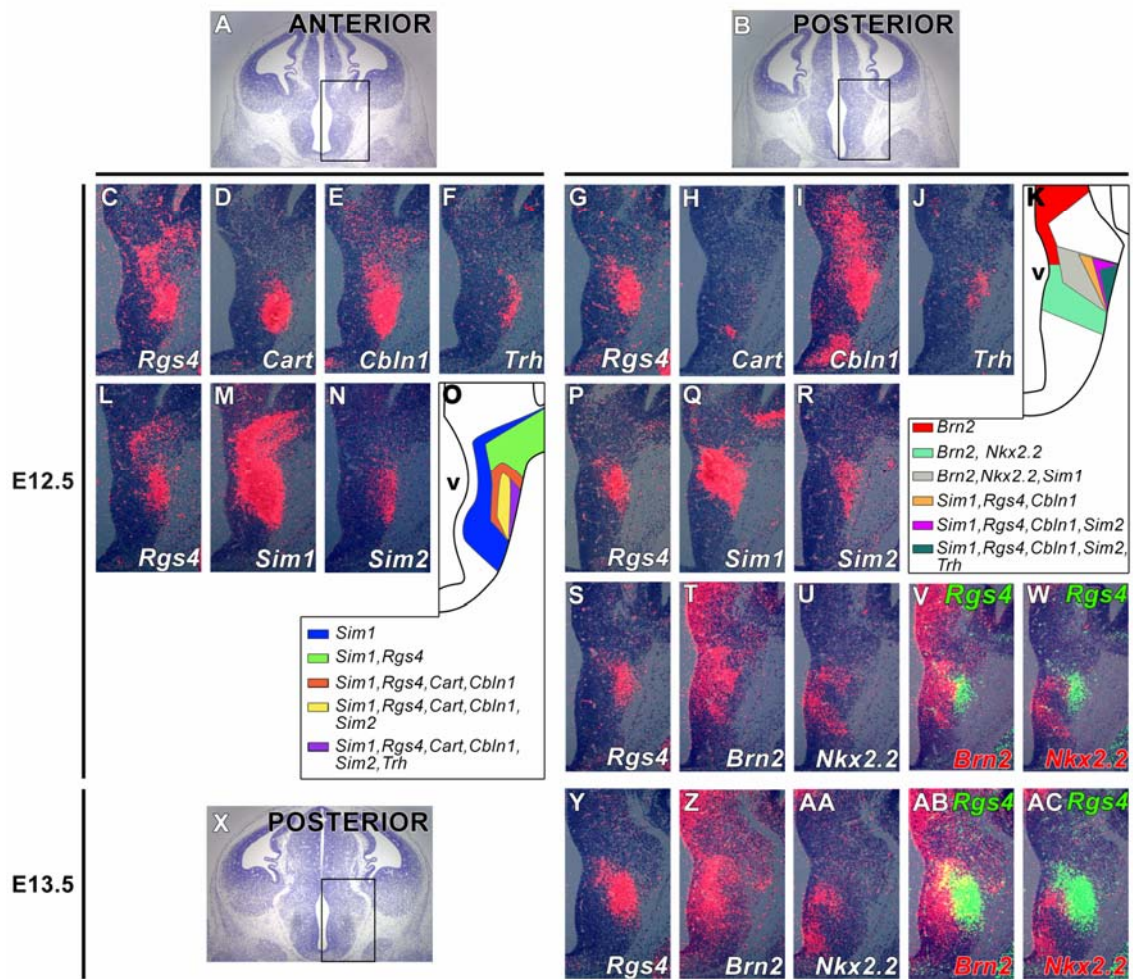


Figure 5.

Figure 5. Lamination of the anterior hypothalamus at E12.5 and E13.5. (A) represents a coronal section through the anterior aspect of the AH of E12.5 *Sim1*^{+/+} embryo; the box corresponds to the region shown in panels C–F and L–N. (B) represents a coronal section through the posterior aspect of the AH of E12.5 *Sim1*^{+/+} embryo; the box corresponds to the region shown in (G–J), (P–R) and (S–W). (X) represents a coronal section through the posterior aspect of the AH of an E13.5 *Sim1*^{+/+} embryo; the box corresponds to the region shown in panels Y–AC. Sections were hybridized with either an *Rgs4* (C, G, L, P, S, Y), *Cart* (D, H), *Cbln1* (E, I), *Trh* (F, J), *Sim1* (M, Q), *Sim2* (N, R), *Brn2* (T, Z) or *Nkx2.2* (U, AA) probe. (C–F), (G–J), (L–N), (P–R), (S–W) and (Y–AC) represent different sets of adjacent sections. In the posterior part of the AH of E12.5 embryos, the *Rgs4* domain of expression (green signal) is complementary to that of *Brn2* (red signal in (V)) and of *Nkx2.2* (red signal in (W)). At E13.5, minimal overlap between domains of *Brn2* and *Rgs4* expression can be detected in the posterior AH (AB) whereas *Nkx2.2* and *Rgs4* expression is complementary (AC). The expression patterns of the markers studied in the anterior and posterior AH of E12.5 embryos are summarized, respectively, in the schemes shown in panels O and K.

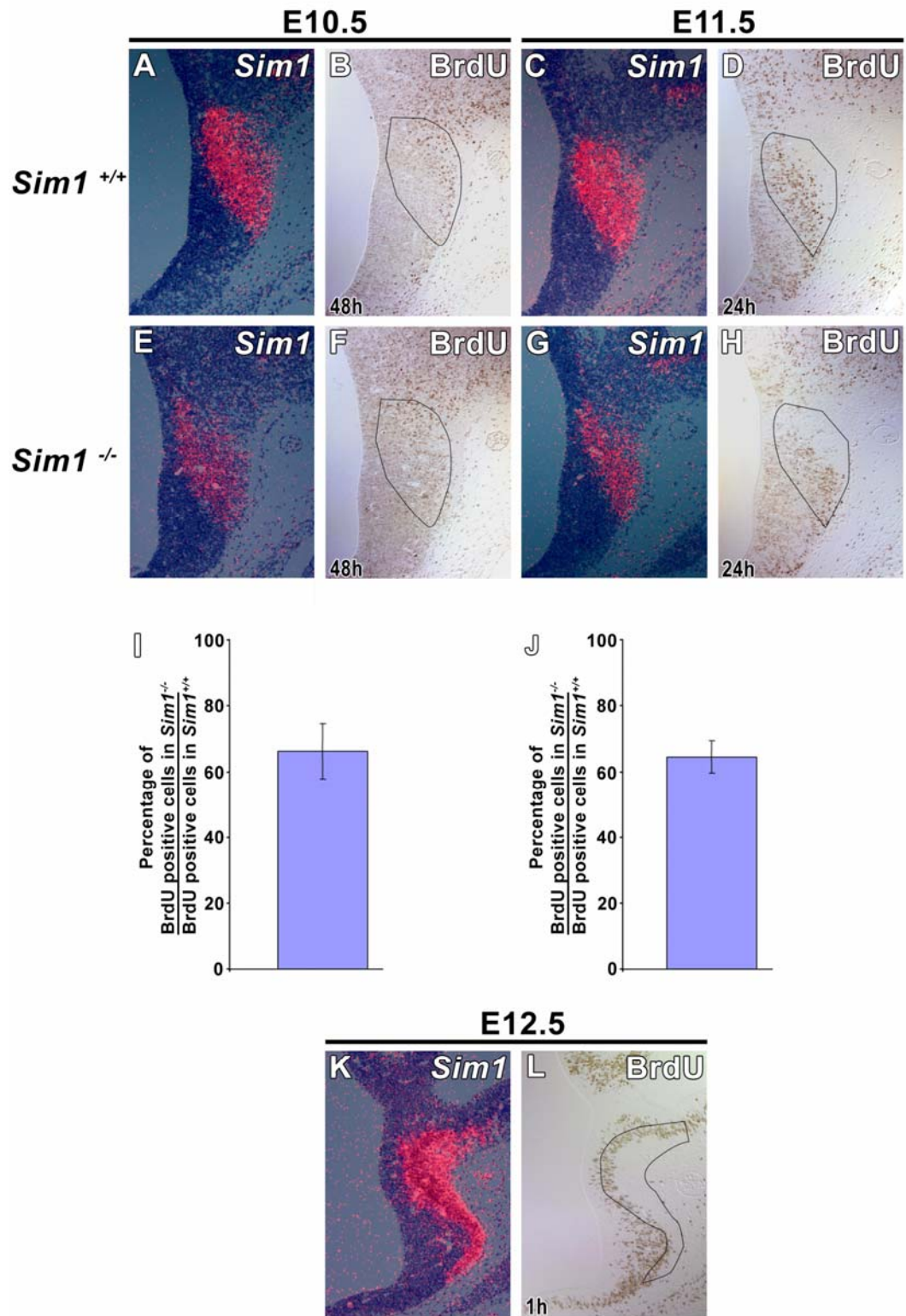


Figure 6.

Figure 6. BrdU incorporation in *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{-/-} embryos. (A–H) BrdU was injected in pregnant mice at E10.5 (A, B, E, F) or E11.5 (C, D, G, H), as indicated. Mice were sacrificed at E12.5. Adjacent coronal sections through the AH of E12.5 *Sim1*^{+/+} (A–D) and *Sim1*^{-/-} (E–H) embryos were hybridized with the *Sim1* probe (A, C, E, G) or stained with a BrdU antibody (B, D, F, H). (I, J) Quantification showed a 30% decrease of BrdU staining in E12.5 *Sim1*^{-/-} embryos compared to E12.5 *Sim1*^{+/+} embryos for both stages of injection ($p < 0.02$; $n = 3$ for each genotype and for each stage). (K, L) BrdU was injected in pregnant mice at E12.5, 1 h before sacrifice. Cells that have incorporated BrdU are contained within the *Sim1* domain of expression.

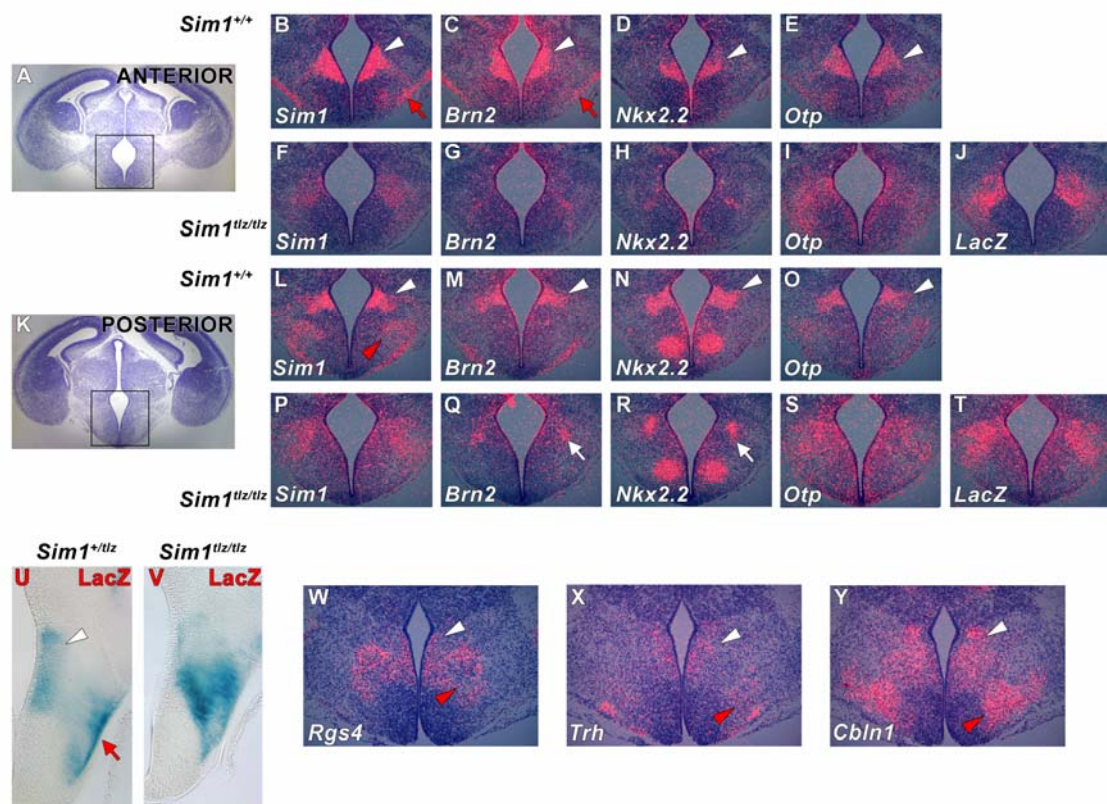


Figure 7.

Figure 7. Marker analysis of the anterior hypothalamus at late embryonic stages. (A) represents a coronal section through the anterior aspect of the PVN of E15.5 embryos; the box corresponds to the region shown in (B–E) and (F–J). (K) represents a coronal section through the posterior aspect of the PVN of E15.5 embryos; the box corresponds to the region shown in (L–O) and (P–T). Adjacent coronal sections of a E15.5 *Sim1*^{+/+} embryo (B–E, L–O) are compared to adjacent coronal sections of a E15.5 *Sim1*^{tlz/tlz} littermate embryo (F–J, P–T). These sections were hybridized with *Sim1* (B, F, L, P), *Brn2* (C, G, M, Q), *Nkx2.2* (D, H, N, R), *Otp* (E, I, O, S) or *LacZ* (J, T) probes. (U, V) show coronal sections through the PVN of E14.5 *Sim1*^{+/-} (U) or *Sim1*^{tlz/tlz} (V) embryos that were stained with β -galactosidase. (W–Y) Coronal sections through the PVN of E18.5 embryos were hybridized with *Rgs4* (W), *Trh* (X) and *Cbln1* (Y) probes. The white arrowheads indicate the PVN, whereas the red arrows indicate the SON. The red arrowheads show domains of expression in the lateral AH. The white arrows indicate persistent expression of *Brn2* (Q) and *Nkx2.2* (R) in the AH of *Sim1*^{-/-} embryos.

CHAPITRE IV: Caractérisation d'un transgène permettant une expression spécifique au sein du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus en développement.

Introduction :

Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) est un régulateur critique de nombreux processus physiologiques essentiels à la survie tels que le maintien de l'équilibre énergétique et le contrôle de la pression artérielle. Plusieurs études de perte de fonction chez la souris ont mis en évidence l'implication de cinq facteurs de transcription – *Sim1*, *Arnt2*, *Otp*, *Brn2* et *Sim2* – dans la différenciation des cinq types cellulaires majeurs qui peuplent le PVN. Le dimère SIM1:ARNT2 en parallèle avec OTP agissent à la tête de cette cascade et maintiennent l'expression de *Brn2* et *Sim2*. Les souris homozygotes pour un allèle nul de *Sim1* ou *Otp* décèdent précocement après la naissance probablement dû à leur défaut hypothalamique. Également, les souris mutantes pour *Brn2* présentent une létalité précoce et ne possèdent aucun neurone à OT, AVP et CRH. Ces études de perte de fonction ont permis de mettre en évidence le rôle clé de nombreux gènes au cours du développement du PVN mais non pas permis de répondre à toutes les questions concernant leur rôle spécifique à savoir entre autres si *Brn2* est le seul médiateur de *Sim1* en ce qui concerne la différenciation des cellules OT, AVP et CRH et/ou si *Sim1* et *Brn2* ont des effets sur la prolifération cellulaire ou sur le recrutement de progéniteurs et sur leur conversion en des types cellulaires spécifiques au PVN. Un élément permettant une approche de gain de fonction chez la souris pourrait permettre de répondre à ces questions. Pour ce faire, un élément régulateur présent dans le promoteur d'OTP a été identifié et caractérisé. Par transgénèse transitoire, cet élément permet une expression spécifique au sein du PVN. Des lignées stables de souris surexprimant *Brn2* ou *Sim1* sous le contrôle de cet élément sont en train d'être établies. L'étude du phénotype de ces souris et leur croisement avec les souris hétérozygotes pour un allèle nul de *Sim1* dans le but de générer des souris *Sim1*^{-/-} mais surexprimant *Sim1* ou *Brn2* grâce au transgène, nous permettra éventuellement de répondre à des questions d'intérêt concernant ces deux gènes au cours du développement hypothalamique.

Résultats et Discussion :

La comparaison de séquences d'ADN génomique entre espèces très divergentes, telles que l'homme et le poisson fugu, a été démontré comme étant un bon

outil de prédiction pour identifier des éléments fonctionnels impliqués dans la régulation de l'expression génique (Ahituv, N. et al. 2004; Brenner, S. et al. 1993). En effet, la séquence des éléments neutres a plus tendance à diverger entre espèces distinctes alors que les éléments fonctionnels sont soumis à une plus grande pression de conservation. Basée sur cette idée, la comparaison des séquences d'ADN génomique de 5 espèces – rat, souris, humain, poulet et poisson-zèbre – en amont et en aval des gènes *Sim1*, *Brn2* et *Otp* a été effectuée à l'aide du logiciel *Genome Vista* (Couronne, O. et al. 2003). Les critères de stringence, 70% d'identité sur au moins 150 paires avec une valeur $P < 0.001$, ont permis l'identification de quatre blocs de séquence conservés sur moins de 100 Kb en amont du site d'initiation de la transcription (SIT) d'*Otp* (Fig. 1A). Aucun bloc répondant à ces mêmes critères de stringence n'a pu être identifié en aval d'*Otp* ou en amont et en aval des gènes *Brn2* et *Sim1*. Parmi ces quatre blocs, un se situe à plus de 80 kb du SIT d'*Otp* dans une séquence intronique du gène *Tcba* situé en 5' d'*Otp*. Les trois autres blocs se situent sur 7 Kb en amont du SIT. Ces trois derniers blocs sont qualifiés d'ultraconservés (100% d'identité sur au moins 200 paires de bases entre les génomes de l'humain, de la souris et du rat) (Ahituv, N. et al. 2007b), Fig. 1B).

Deux constructions ont été réalisées pour évaluer l'implication de ces trois blocs de séquence dans le contrôle de l'expression d'*Otp*. La première construction, nommée OTP5-LacZ, inclut les deux blocs les plus proximaux du SIT suivi du gène rapporteur encodant la β -galactosidase (Fig. 2B). La deuxième construction, nommée OTP7-LacZ, inclus les trois blocs de séquences conservées (Fig. 2B). Ces deux constructions ont été testées par transgénèse transitoire et l'évaluation de l'expression du transgène a été démontrée par la présence de l'activité β -galactosidase (Fig. 2C). Pour OTP5-LacZ, 23 embryons de souris à E12.5 ont été recueillis. Sur ces 23 embryons, seuls 13 étaient porteurs du transgène toutefois aucun n'embryon était positif à la coloration LacZ. Pour OTP7-LacZ, 37 embryons ont été recueillis, 8 étaient porteurs du transgène et 4 d'entre eux ont révélé une coloration positive à la β -galactosidase au sein de l'hypothalamus antérieur (Fig. 2D). Le transgène OTP7-LacZ a donc une pénétrance de 50% ce qui est assez élevé prenant en considération que des éléments indépendants de son activité, tels que le site d'insertion du transgène, peuvent affecter son expression.

De manière intéressante, ce patron d'expression ressemble au patron d'expression endogène du gène *Sim1* préalablement établi par hybridation *in toto* (Caqueret, A. et al. 2006).

Récemment, une analyse à grande échelle, « *The VISTA Enhancer Browser* », a été lancée pour identifier et tester fonctionnellement les séquences ultraconservées entre les génomes de l'homme, de la souris et du rat (Lawrence Berkeley National Laboratory. 2009). Au sein de cette base de données, un élément conservé situé entre les gènes *Tcba* et *Otp* a été testé. Cet élément permet une expression spécifique dans le diencéphale ventrale. Cet élément occupe la position chr13:95,969,595-95,970,124 sur le génome de la souris. De manière intéressante cet élément englobe uniquement le premier bloc conservé identifié par notre approche confirmant l'implication de ce bloc dans la spécificité d'expression d'*Otp* au sein de l'hypothalamus antérieur. Les 2 Kb de séquence en amont de l'élément OTP5 semblent donc être essentiels à l'expression d'*Otp* au sein de l'hypothalamus antérieur. Le premier bloc conservé qui occupe les positions chromosomiques chr13:95,969,634-95,969,834 sur le génome de la souris est donc probablement à la source de cette spécificité d'expression.

Une lignée stable de souris OTP7-LacZ a été générée, afin de vérifier à différents stades embryonnaires si l'expression de ce transgène est similaire dans le temps et dans l'espace à l'expression endogène d'*Otp*. Jusqu'à présent, l'expression du transgène a été étudiée à E12.5 où son patron d'expression est limité à l'hypothalamus antérieur et à E14.5 où on peut observer un marquage du PVN et du SON en devenir par la coloration LacZ (Fig. 3B et C). Ce dernier résultat corrèle bien le patron d'expression endogène d'OTP, reste à voir à des stades plus tardifs si le patron d'expression est conservé et si on retrouve l'expression de ce transgène dans le noyau arqué de l'hypothalamus où *Otp* est normalement exprimé.

Deux autres constructions ont été réalisées pour permettre la surexpression de *Brn2* ou *Sim1* et du gène rapporteur *Gfp* (*Green Fluorescent Protein*) au cours du développement du PVN. Ces deux constructions sont sous le contrôle de la séquence OTP7, incluant les 3 blocs de séquences conservées, suivi du gène surexprimé – *Brn2* ou *Sim1*– qui est séparé de la GFP par un élément IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*). La GFP permettra de suivre à la trace les cellules où est surexprimé ce transgène. Ces deux constructions ont été employées pour créer des lignées stables qui sont en train d’être caractérisées par hybridation *in situ* afin de vérifier l’expression de l’ARNm encodant la GFP et le gène surexprimé. Jusqu’à présent, 5 souris fondatrices ont été obtenues pour le transgène OTP7-Sim1. Sur 4 fondateurs testés, aucun n’exprime la GFP. Pour le transgène OTP7-Brn2, 16 souris fondatrices ont été obtenues. Sur 7 fondateurs testés, 4 expriment la GFP (Fig. 3A). La pénétrance pour le transgène OTP7-Brn2 est similaire à la pénétrance obtenue lors de la transgénèse transitoire alors que ce n’est pas le cas pour le transgène OTP7-Sim1. De nombreuses possibilités pourraient expliquer une telle différence. D’abord, le plus petit nombre de souris testé a probablement un impact. Également, le lieu d’insertion du transgène dans le génome, la présence de gènes modificateurs ou des modifications épigénétiques dues à la manipulation des embryons pourraient être en cause (Surani, M. A. 1991). L’utilisation d’élément isolateur lors de la construction des transgènes ou la réalisation d’une transgénèse ciblée auraient pu limiter l’impact des gènes modificateurs et de l’environnement génique sur l’expression des transgènes OTP7-Sim1 et OTP7-Brn2.

Le patron d’expression du transgène OTP7-Brn2 a été étudié comparativement au patron d’expression endogène de *Brn2*. Il est à noter que *Brn2* est surexprimé dans une région où il n’est normalement pas présent chez l’embryon de souris de type sauvage (Fig. 3D à I) et où la *Gfp* est également exprimée. L’analyse histochimique a permis de démontrer que des protéines étaient produites pour ce messenger bicistronique encodant BRN2 et la GFP (Fig. 3J et K). Le phénotype des deux types de souris transgéniques, OTP7-Brn2 et OTP7-Sim1, devra être étudié plus en profondeur, notamment afin de vérifier si les gènes d’intérêt sont bien surexprimés et voir l’impact

de leur surexpression sur le développement du PVN. Par la suite, ces souris seront croisées avec des souris hétérozygotes pour un allèle nul de *Sim1*. Dans le cas, du transgène OTP7-Sim1 nous espérons pouvoir récupérer le phénotype des souris *Sim1*^{-/-} et voir si la surexpression du transgène dans l'hypothalamus antérieur permet la survie des souriceaux. Si c'est le cas ceci nous permettra d'établir que la létalité des souris *Sim1*^{-/-} est bien due à leur défaut hypothalamique. Par ailleurs, les souris *Sim1*^{-/-} présentent également un défaut développemental au niveau du corps mammillaire. Puisqu'*Otp* n'est pas exprimé au cours du développement des corps mammillaires, le transgène OTP7-Sim1 ne devrait pas permettre la surexpression de *Sim1* dans les corps mammillaires des souris *Sim1*^{-/-}. Ceci nous permettra éventuellement d'étudier l'impact de la perte d'expression de *Sim1* spécifiquement au cours du développement des corps mammillaires et le phénotype qui en découle chez les souris adultes. Dans le cas du transgène OTP7-Brn2, le croisement avec les souris *Sim1*^{-/-} pourra permettre de démontrer, entre autres, si *Brn2* est l'unique médiateur de *Sim1* dans la différenciation des cellules à OT, AVP et CRH.

Matériel et Méthodes :

Analyse bioinformatique

150 Kb de séquences d'ADN génomique de l'homme, la souris, le poisson-zèbre, le poulet et le rat situés en 5' et en 3' des gènes *Sim1*, *Brn2* et *Otp* ont été alignés à l'aide du programme *Genome Vista* (Couronne, O. et al. 2003). Ces séquences ont été traitées pour identifier les éléments ultraconservés qui ont 100% d'identité sur au moins 200 paires de bases entre les génomes de l'humain, de la souris et du rat ou au moins 70% d'identité sur 150 paires de bases entre les génomes de l'humain, de la souris, du poisson-zèbre et du poulet (Ahituv, N. et al. 2007b; Bejerano, G. et al. 2004).

Construction des vecteurs OTP5-LacZ et OTP7-LacZ et transgénèse transitoire

Un fragment de 5 Kb (construction OTP5-LacZ) en amont du SIT d'*Otp* a été amplifié par PCR à partir d'ADN génomique isolé de foie de souris de type sauvage C57bl6 avec

un mélange des polymérases Pfu-Taq. Un autre fragment de 7 Kb (construction OTP7-LacZ) en amont du SIT d'*Otp* a été amplifié par PCR avec la polymérase LA Taq (Takara Bio Inc.) à partir du clone BAC RP23-261P7 (BACPAC Ressources). Ces 2 fragments ont été clonés en amont du gène rapporteur LacZ isolé du vecteur p β galBasic (Clontech, Genbank accession n° U13184). Le gène rapporteur est suivi d'une séquence polyA dérivé du virus SV40. Les deux constructions ont été amplifiées dans des bactéries DH5 α et purifiées à l'aide du kit *Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen). 100 μ g de chacune de ces constructions ont été digérés avec l'enzyme NsiI pour isoler le transgène du vecteur de clonage pCRII (Invitrogen). La purification des transgènes et leur injection pronucléaire dans des embryons de souris B6C3F1 ont été réalisées à la plateforme de transgénèse de l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal. Les embryons injectés avec le transgène ont été prélevés à E12.5 et colorés pour détecter l'activité de la β -galactosidase selon un protocole préalablement décrit (Marion, J. F. et al. 2005). Le sac vitellin des embryons a été conservé en vue d'en isoler l'ADN génomique pour le génotypage. Les embryons ont été génotypés par PCR avec des oligos dirigés contre le gène LacZ, LacZ-1 : GCGAATACCTGTTCCGTGAT et LacZ-2 : CAAAATCCATTTTCGCTGGT.

Construction des vecteurs OTP7-Sim1 et OTP7-Brn2 et établissement des lignées stables

Les ADNc des gènes *Brn2* et *Sim1* ont été amplifiés par RT-PCR à partir d'ARN d'embryon au stade E18.5 de souris de type sauvage. Une séquence kozak (CCGCCATGG) a été ajoutée en amont de ces deux gènes via les oligos utilisés lors du RT-PCR. En aval de chacun de ces gènes a été cloné une séquence IRES-GFP-PolyA dérivé du vecteur pAdCMV5-IRES-GFP (Yang, C. et al. 2006). Chacune de ces construction a été sous clonée en aval du fragment de 7 kb situé en amont du SIT d'*Otp*. Ces construction ont été amplifiées et isolées comme décrit ci-dessus. Les constructions ont été purifiées et injectées à l'Institut de Recherches Cliniques de Montréal. Une biopsie de bout de queue a été réalisée sur les souris fondatrices pour en isoler l'ADN génomique. Les souris ont été génotypées par PCR avec des oligos contre la GFP, GFP-1 : TGACGGGAAGTACAAGACAC et GFP-2 : AAAGGGCAGATTGTGTGGAC.

Analyse du phénotype des lignées stables

Les souris fondatrices de souche génétique mixte B6C3F1 ont été croisées avec des souris de type sauvage C57Bl6. Les embryons, des générations F1 ou F2, ont été prélevés à E12.5 et fixés au PFA 4% pendant 12h puis préparés pour être coupés au cryostat. Des coupes de 12 μ m d'épaisseur ont été réalisées pour prélever toute la région de l'hypothalamus. Les coupes ont été placées sur des lames chargées en série adjacente de 4 lames. Ces coupes ont été hybridées avec les sondes *Sim1*, *Brn2* ou *Gfp* selon la lignée analysée et selon un protocole préalablement décrit (Caqueret, A. et al. 2005a) ou utilisé en immunohistochimie avec des anticorps dirigés contre BRN2 (SantaCruz Biotechnology) ou la GFP (Invitrogen) selon un protocole préalablement décrit (Castro, D. S. et al. 2006). Les sondes *Sim1* et *Brn2* ont été préalablement décrites (Michaud, J. L. et al. 1998). La sonde *Gfp* a été générée par PCR avec des amorces dirigées contre la séquence de la *Gfp* présente dans le plasmide pAdCMV5-IRES-GFP (Yang, C. et al. 2006). Les souris OTP7-LacZ fondatrices ont également été croisées avec des souris C57Bl6. Le phénotype des embryons isolés de ces croisements ont été analysés par coloration LacZ.

Références:

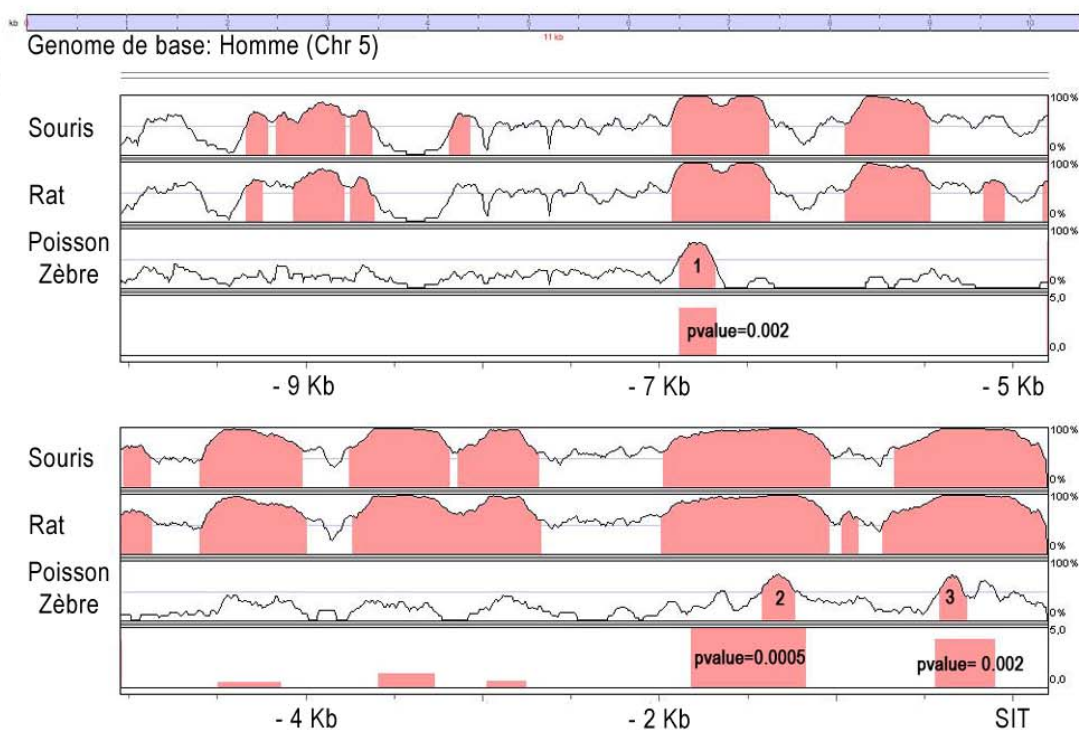
- Ahituv, N., Rubin, E. M., and Nobrega, M. A. (2004) Exploiting human--fish genome comparisons for deciphering gene regulation. *Hum.Mol.Genet.* 13 Spec No 2: R261-R266.
- Ahituv, N., Zhu, Y., Visel, A., Holt, A., Afzal, V., Pennacchio, L. A., and Rubin, E. M. (2007) Deletion of ultraconserved elements yields viable mice. *PLoS. Biol.* 5: e234-
- Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W. J., Mattick, J. S., and Haussler, D. (2004) Ultraconserved elements in the human genome. *Science* 304: 1321-1325.
- Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., and Aparicio, S. (1993) Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* 366: 265-268.
- Caqueret, A., Boucher, F., and Michaud, J. L. (2006) Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. *Dev. Biol.* 298: 95-106.
- Caqueret, A., Coumailleau, P., and Michaud, J. L. (2005) Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo. *Dev. Dyn.* 233: 652-658.
- Castro, D. S., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I. J., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J. A., Nguyen, L., Gossler, A., Gottgens, B., Matter, J. M., and Guillemot, F. (2006) Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Dev. Cell* 11: 831-844.
- Couronne, O., Poliakov, A., Bray, N., Ishkhanov, T., Ryaboy, D., Rubin, E., Pachter, L., and Dubchak, I. (2003) Strategies and tools for whole-genome alignments. *Genome Res.* 13: 73-80.
- Lawrence Berkeley National Laboratory. (2009) VISTA Enhancer Browser. <http://enhancer.lbl.gov>
- Marion, J. F., Yang, C., Caqueret, A., Boucher, F., and Michaud, J. L. (2005) Sim1 and Sim2 are required for the correct targeting of mammillary body axons. *Development* 132: 5527-5537.
- Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R., and Fan, C. M. (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 12: 3264-3275.
- Surani, M. A. (1991) Influence of genome imprinting on gene expression, phenotypic variations and development. *Hum. Reprod.* 6: 45-51.

Yang, C., Gagnon, D., Vachon, P., Tremblay, A., Levy, E., Massie, B., and Michaud, J. L. (2006) Adenoviral-mediated modulation of Sim1 expression in the paraventricular nucleus affects food intake. *J. Neurosci.* 26: 7116-7120.

A

# Bloc	Position chromosomique chez l'homme	Position relative au SIT d'OTP chez l'homme	CONSERVATION du BLOC			
			homme	souris	Poisson-Zèbre	poulet
A	chr5: 77,101,200 - 77,101,559	- 131 kb (intron du gène TCBA)	X	X		X
B	chr5: 77,056,599 - 77,057,991	- 87,8 kb (intron du gène TCBA)	X	X	X	X
C	chr5: 77,025,510 - 77,025,967	- 56 kb (intron du gène TCBA)	X	X		X
D	chr5: 76,994,092 - 76,994,248	- 24 kb	X	X		X
1	chr5: 76,976,599 - 76,977,155	- 7 kb	X	X	X	X
F	chr5: 76,975,700 - 76,976,091	- 6 kb	X	X		X
G	chr5: 76,974,241 - 76,974,537	- 5 kb	X	X		X
2	chr5: 76,971,040 - 76,971,801	- 1,5 kb	X	X	X	X
3	chr5: 76,970,134 - 76,970,278	- 200 bp	X	X	X	X

B



C

Bloc	Position chromosomique	Paires bases conservées	Degré de conservation (%)
1	Chr13 : 95,969,634-95,969,834	201	71.6
2	Chr13 : 95,975,179-95,975,362	185	68.9
3	Chr13 : 95,976,211-95,976,354	144	69.4

Figure 1.

Figure 1. Identification des éléments conservés entre espèces dans la région promotrice du gène *Otp*. A) Position chromosomique chez l'homme des blocs conservés sur une région de 100 Kb en amont du SIT d'*Otp*. Les blocs A, 1, 2 et 3 sont conservés entre 5 espèces : homme, rat, souris, poisson-zèbre et poulet. Les blocs 1, 2 et 3 sont qualifiés d'ultraconservés. B) Graphique généré par *Genome Vista* montrant le degré de conservation des blocs 1, 2 et 3, situés sur 10 Kb en amont du SIT d'*Otp*, ainsi que la valeur P qui leur est associée. C) Position chromosomique chez la souris des blocs 1, 2 et 3 ainsi que leur longueur et degré de conservation entre la souris et le poisson-zèbre.

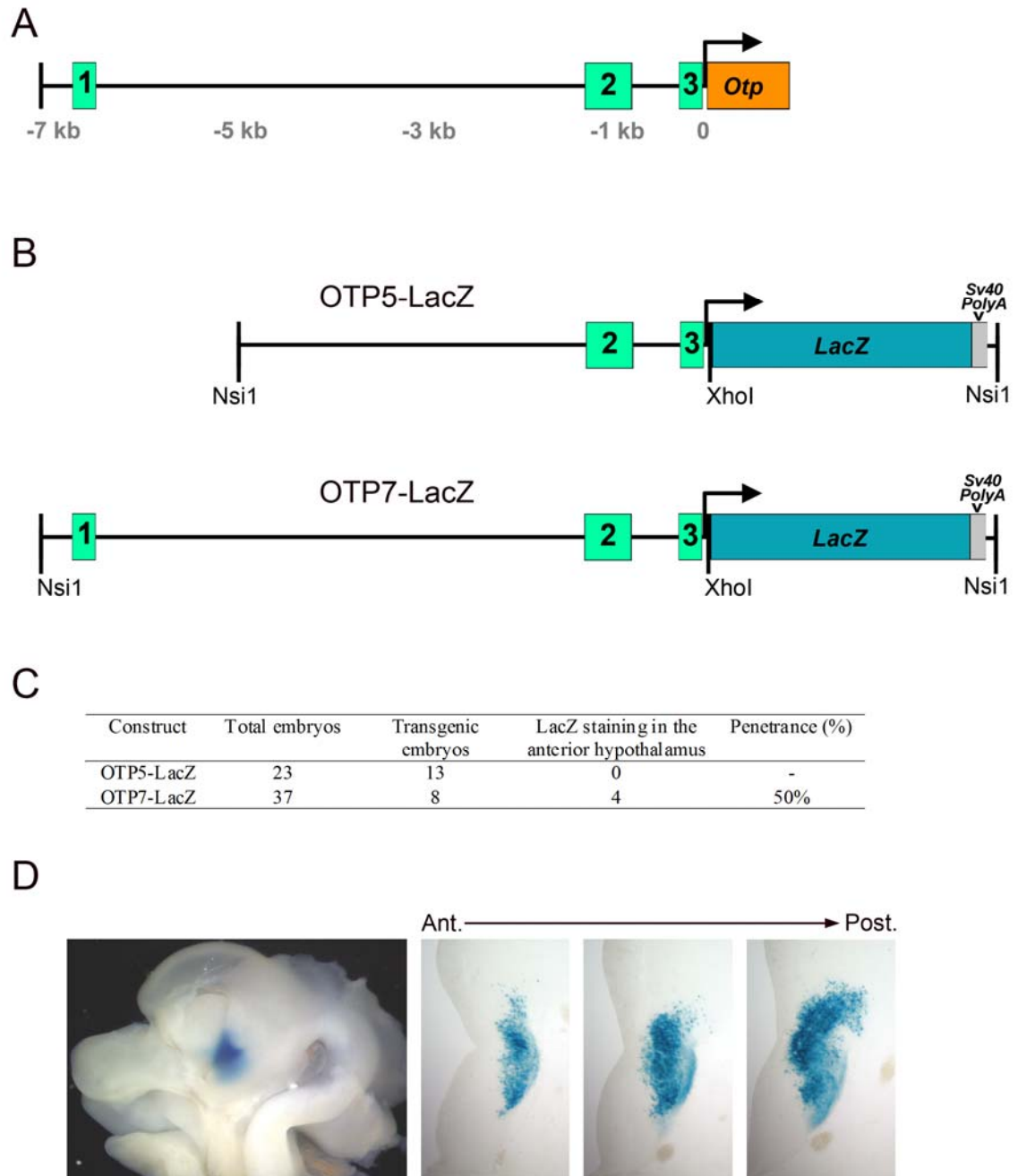


Figure 2.

Figure 2. Caractérisation par transgénèse transitoire des éléments conservés dans le promoteur d'*Otp*. A) Schéma représentant le promoteur d'*Otp* et la position des 3 blocs de séquences conservés par rapport au SIT. B) Schéma représentant les deux constructions, OTP5-LacZ et OTP7-LacZ, utilisées en transgénèse transitoire pour évaluer la capacité de ces 3 blocs de séquence à permettre l'expression du gène rapporteur LacZ. C) Tableau représentant le nombre total d'embryons prélevés et d'embryons transgéniques lors de la transgénèse transitoire pour chacune des deux constructions. Seule, la construction OTP7-LacZ a permis une expression spécifique du gène rapporteur LacZ dans l'hypothalamus antérieur. D) Coupe transversale d'un cerveau de souris transgénique OTP7-LacZ à E12.5 présentant une coloration positive dans l'hypothalamus antérieur. Coupes coronales du même cerveau représentant d'antérieur en postérieur le patron d'expression du transgène.

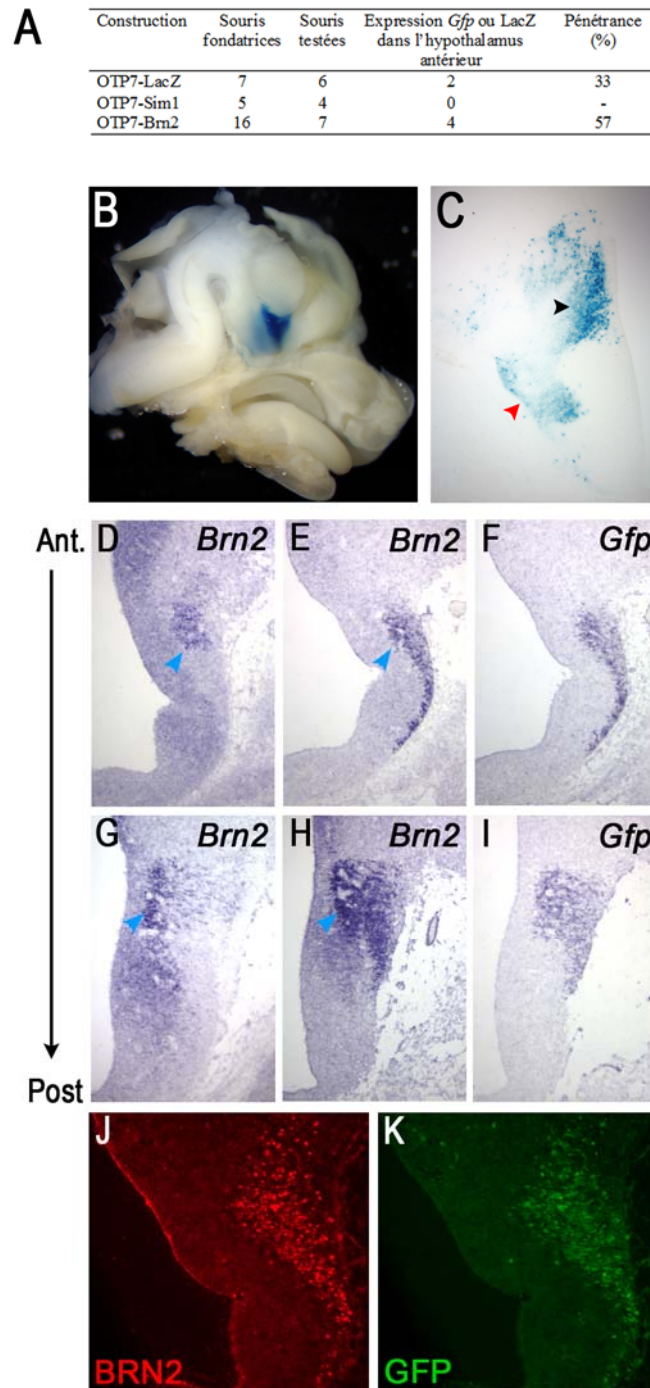


Figure 3.

Figure 3. Établissement des lignées stables pour les transgènes OTP7-LacZ, OTP7-Sim1 et OTP7-Brn2. A) Tableau représentant le nombre de souris fondatrices obtenues pour chaque lignée ainsi que le nombre de souris testées et la pénétrance des transgènes. B) Coupe transversale d'un cerveau de souris OTP7-LacZ à E14.5 présentant une coloration positive dans l'hypothalamus antérieur. C) Coupe coronale du même cerveau où on peut observer la coloration LacZ au niveau du PVN (flèche noire) et SON (flèche rouge). D-I) Coupes coronales d'un cerveau de souris OTP7-Brn2 à E12.5 hybridées avec les sondes *Brn2* (D,E, G et H) ou *Gfp* (F et I) sur un embryon de souris de type sauvage (D et G) ou un embryon porteur du transgène OTP7-Brn2 issu de la même portée (E, F, H et I). Les flèches turquoise pointent le patron d'expression endogène de *Brn2*. J-K) Immunohistochimie sur un embryon de souris OTP7-Brn2 à E12.5. J) Expression de la protéine BRN2. K) Expression de la protéine GFP. Noter que BRN2 est exprimé au même endroit que la GFP et que son patron ne ressemble pas au patron d'expression de l'ARNm endogène de *Brn2* (D) mais plutôt au patron d'expression de l'ARNm du transgène OTP7-Brn2 (E).

CHAPITRE V: Établissement du transcriptome des noyaux
paraventriculaire et arqué de l'hypothalamus au 14eme jour embryonnaire
chez la souris.

Introduction

Les micropuces à ADN sont un outil puissant qui permet de mesurer et de comparer l'expression de milliers de gènes entre deux tissus ou deux conditions expérimentales différentes. Cet outil est de plus en plus employé pour comprendre les fonctions de certaines régions du cerveau et pour aider à poser des hypothèses sur les mécanismes moléculaires qui en sous-tendent la fonction (Lockhart, D. J. and Barlow, C. 2001). Toutefois, le cerveau étant très hétérogène au point de vue cellulaire, il peut être difficile d'en faire ressortir toutes les subtilités en étudiant le transcriptome de régions qui sont prélevées manuellement à l'aide de critères morphologiques. La tâche est encore plus compliquée au niveau du cerveau en développement puisque les structures sont plus petites, plus fines et pas forcément facilement repérables d'un point de vue morphologique. La microdissection au laser (ML) est une approche qui a permis d'étudier le transcriptome d'aussi peu qu'une cellule et est une technique qui peut facilement permettre de prélever une sous-population cellulaire dans un tissu hétérogène (Bonaventure, P. et al. 2002; Kirby, J. et al. 2007). Coupler la ML aux micropuces à ADN est probablement l'avenue à emprunter pour établir le transcriptome de noyaux distincts au sein du système nerveux central (Paulsen, S. J. et al. 2009).

Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) est impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques essentiels à la survie. De nombreuses études de perte de fonction chez la souris ont mis en évidence l'implication d'une cascade de facteurs de transcription – *Sim1*, *Otp*, *Brn2*, *Sim2* – nécessaire à la différenciation des 5 types cellulaires majeurs qui le peuplent (Acampora, D. et al. 1999; Goshu, E. et al. 2004; Michaud, J. L. et al. 1998; Nakai, S. et al. 1995). Une première tentative pour étudier le transcriptome de ce noyau au tout début de sa différenciation (à E12.5) a permis d'identifier quelques facteurs de transcription agissant en aval de *Sim1*, tels que *Irx3* et *Neurod6*, qui sont susceptibles d'affecter le développement du PVN (Caqueret, A. et al. 2006). Toutefois, cette étude a été réalisée sur l'hypothalamus antérieur, région qui englobe le PVN prospectif mais aussi d'autres structures et n'avait

probablement pas la puissance nécessaire pour identifier les facteurs de transcription spécifiquement impliqués dans la différenciation du PVN. Nous avons donc décidé d'employer la ML couplée aux micropuces à ADN pour mettre à jour le transcriptome du PVN chez des embryons de souris à E14.5, stade où cette structure est définissable par l'expression du gène *Sim1* et où elle est encore en pleine différenciation cellulaire. Nous avons choisi de comparer le transcriptome du PVN au transcriptome du noyau arqué (ARC), un autre noyau hypothalamique crucial pour le contrôle de l'appétit, afin d'en faire ressortir facilement les gènes qui y sont spécifiquement exprimés. Cette approche couplée à l'hybridation *in situ*, nous a permis de prélever le PVN et l'ARC chez des embryons de souris à E14.5 alors qu'à ce stade ces structures ne sont pas distinguables des tissus les entourant d'un point de vue morphologique. Cette approche nous a offert la possibilité d'identifier 234 et 470 gènes respectivement spécifiques au PVN et à l'ARC. Parmi ces gènes, nous avons retrouvé 34 facteurs de transcription spécifiques au PVN et 76 autres plus fortement exprimés dans l'ARC. Ces facteurs de transcription représentent de nouveaux gènes candidats qui ont le potentiel d'être impliqués dans la différenciation des divers types cellulaires qui peuplent ces deux noyaux.

Résultats et Discussion :

Afin d'identifier des facteurs de transcription spécifiques au développement du PVN, nous avons mis au point une technique de microdissection au laser couplée à l'hybridation *in situ* (HIS) qui nous a permis d'isoler et de comparer, par une approche de micropuce, les transcriptomes du PVN et de l'hypothalamus médiobasal (ARC) chez des embryons de souris de type sauvage à E14.5. Puisqu'à ce stade ces deux noyaux ne sont pas reconnaissables d'un point de vue morphologique, nous nous sommes basés sur les patrons d'expression de 2 gènes qui leur sont caractéristiques. En effet à ce stade, le facteur de transcription *Sim1* définit clairement le PVN et est essentiel à son développement et de manière similaire, l'ARC peut être délimité par le patron d'expression de *Nkx2.1* qui est aussi essentiel à son développement. Sur des coupes adjacentes aux coupes microdisséquées au laser, nous avons donc révélé par HIS ces deux structures (Fig. 1A et E). Ces coupes hybridées ont servi de point de repères pour

définir les régions devant être prélevées par ML (Fig. 1B-D,F-H). Nous avons prélevé les cellules du PVN et de l'ARC sur les mêmes embryons de souris, le tout en triplicata. L'ARN isolé de ces structures a été analysé sur les micropuces d'Affymetrix MOE 430 2.0 qui représentent 39 000 transcrits. Les transcriptomes de ces deux structures ont été comparés à l'aide du logiciel FlexArray avec la méthode de normalisation RMA et la méthode statistique Empirical Bayes qui convient parfaitement aux petits échantillons (Wright, G. W. and Simon, R. M. 2003). Pour un des échantillons du PVN, les résultats obtenus divergeaient des autres échantillons. Cet échantillon et son équivalent de l'ARC ont été mis de côté pour l'analyse afin de ne pas biaiser les résultats. L'analyse nous a permis d'identifier 234 gènes spécifiques au PVN dont 34 facteurs de transcription (Fig. 1I). Les trois gènes les plus fortement exprimés étaient *Sim1*, *Brn2* et la CRH soit deux facteurs de transcription essentiels au développement de cette structure et un de ses marqueurs de différenciation terminale (Fig. 1J). De plus, parmi les 34 facteurs de transcription, 3 autres –*Rxr γ* , *Nkx2.2*, *Lhx5*– avaient déjà été caractérisés dans des études précédemment réalisées au sein du laboratoire (Tableau 1; Caqueret, A. et al. 2006). Également, les facteurs de transcription *Plzf* et *Nhlh1* étaient déjà connus comme étant exprimés au sein de l'hypothalamus antérieur (Avantaggiato, V. et al. 1995; Theodorakis, K. et al. 2002). Finalement, le facteur de transcription *Fezf2* est un régulateur de la transcription d'OTP et est essentiel à la différenciation des neurones à isotocine (équivalent de l'oxytocine) chez le poisson-zèbre (Blechman, J. et al. 2007). Le fait que ce gène soit exprimé au sein du PVN en développement chez la souris peut suggérer, sans toutefois le prouver, que sa fonction est conservée chez les mammifères. Par ailleurs, d'autres gènes spécifiquement reliés au développement du système nerveux central ont été identifiés et représentent également des candidats intéressants (Tableau 1).

En ce qui concerne l'ARC, 470 gènes dont 76 facteurs de transcription y étaient plus fortement exprimés (Fig. 1I; Tableau 2). NPY et POMC, deux marqueurs de différenciation terminale de l'ARC, y étaient fortement représentés validant en quelque sorte notre méthodologie (Fig. 1J). Quant à la *Ss*, elle est également plus fortement exprimée au sein de l'ARC alors qu'on la retrouve aussi au sein du noyau antérieur périventriculaire qui est contigu au PVN où elle est probablement plus faiblement

exprimée. Le facteur de transcription *Otp* est exprimé à la fois au sein du PVN et de l'ARC, de manière intéressante le niveau d'expression de ce gène sur les micropuces était équivalent dans les deux noyaux. Nous sommes en train de parfaire la validation de ces résultats en clonant des ADNc correspondant à 15 facteurs de transcription exclusifs au PVN et à 8 facteurs de transcription spécifiques à l'hypothalamus médiobasal afin d'étudier leur patron d'expression par HIS. Jusqu'à présent, les gènes validés pour le PVN – *Bhlhb5*, *St18*, *Neurod1*, *Nfia*, *Olig1*, *Fezf2* – et pour l'ARC – *Six6*, *Tcf7l2* – sont effectivement et spécifiquement bien exprimés au sein de ces structures (Fig. 2). Cette étude va nous permettre de faire ressortir les facteurs de transcription spécifiques au PVN dont nous pourrions éventuellement rapidement étudier la fonction par gain de fonction ou notamment par perte de fonction en faisant appel aux ressources de la base de données IGTC « *International Gene Trap Consortium* », qui recense toutes les lignées de cellules souches embryonnaires de souris contenant des mutations insertionnelles au sein de leur génome ou de gènes spécifiques.

Matériel et Méthodes :

Embryons de souris

Des souris mâles et femelles *CD-1* de type sauvage ont été croisées en fin de journée pour produire des embryons. A E14.5, tôt le matin, les embryons ont été prélevés et disséqués dans du PBS 1X DEPC froid. La tête complète des embryons a été prélevée à l'aide de forceps puis immergée dans un composé « Tissue-Tek O.C.T. » (Sakura Finetek USA) et directement congelée sur glace sèche. Les blocs ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Microdissection au laser

Les blocs d'O.C.T. ont été placés dans le cryostat à -24°C 20 minutes avant le début de la coupe. Des coupes de 7 µm d'épaisseur ont été réalisées pour prélever toute la région du cerveau couverte par l'hypothalamus. Les coupes ont été placées sur des lames non chargées en série adjacente de 3 coupes sur 4 lames. Tout au cours de la coupe, aucune

lame n'a été exposée à une température supérieure à -20°C. 3 des lames de la série de 4 ont été conservées dans des boîtes avec un dessiccateur à -80°C. La quatrième lame a été hybridée simultanément avec les sondes *Sim1* (marquage PVN) et *Nkx2.1* (marquage ARC) selon un protocole d'hybridation en sonde radioactive préalablement décrit (Fan, C. M. et al. 1996). La sonde *Sim1* utilisée ici a déjà été préalablement décrite (Fan, C. M. et al. 1996; Michaud, J. L. et al. 1998). La sonde *Nkx2.1* nous a été généreusement offerte par J.L. Rubenstein (UCSF, Californie). La lame hybridée a servi de référence pour la microdissection au laser (ML) du PVN et de l'ARC sur les 3 autres lames de la série. La ML a été réalisée à l'aide de l'appareil automatisé Autopix 100^E d'Arcturus. Avant la microdissection, les lames ont été colorées à l'hématoxyline selon les directives du manufacturier du kit : *Histogene LCM frozen section staining kit* (Arcturus). Le PVN et l'ARC ont été disséqués en moyenne sur 30 et 20 coupes respectivement sur 3 embryons. Chaque noyau de chaque embryon a été prélevé individuellement sur 1 ou 2 *CapSure LCM macrocaps* (Arcturus).

Micropuces

Immédiatement après la microdissection, les cellules prélevées sur les *macrocaps* ont été isolées à l'aide du kit *Picopure RNA Isolation kit* (Arcturus). Les cellules isolées ont été combinées si plusieurs *macrocaps* avaient été utilisés pour un même noyau d'un même embryon puis conservés dans le tampon de lyse à -80°C. Toutes les isolations d'ARN ont été réalisées en même temps selon les directives du kit précédemment nommé. La qualité de l'ARN isolé a été vérifiée sur le Bionalizer 2100 d'Agilent. Deux cycles d'amplification linéaire ont été réalisés avec le protocole du kit *Genechip Two cycle target* d'Affymetrix. La génération de l'ADNc, son marquage et son hybridation sur les micropuces MOE 430 2.0 d'Affymetrix ont été réalisés la même journée selon les protocoles standards du manufacturier. L'analyse des données des micropuces a été réalisée à l'aide du logiciel FlexArray (Blazejczyk, M. et al. 2007) utilisant la méthode de normalisation RMA et la méthode statistique Empirical Bayes (Wright, G. W. and Simon, R. M. 2003) pour identifier tous les transcrits avec un changement d'expression d'au moins deux fois entre les deux noyaux. La base de données *NetAFFX centre*

database (Affymetrix) a été utilisée pour corrélérer les résultats avec les annotations des gènes représentés sur la micropuce MOE 430 2.0.

Hybridation in situ

Les résultats des micropuces ont été validés par hybridation *in situ* en sonde froide selon un protocole préalablement décrit (Caqueret, A. et al. 2005a). Chaque gène étudié a été hybridé sur des coupes adjacentes de cerveau d'embryons de souris à E14.5 et comparé au patron d'expression de *Sim1* et *Nkx2.1*. Chaque comparaison a été effectuée sur au moins 2 hybridations *in situ* indépendantes. Mis à part, *Sim1* et *Nkx2.1*, toutes les autres sondes ont été générées par RT-PCR à partir d'ARN total isolé de cerveau d'embryon de souris de type sauvage à E18.5. Les séquences des amorces de PCR ont été déduites à partir des séquences d'ARNm des gènes correspondant déposées sur Genebank.

Références:

- Acampora, D., Postiglione, M. P., Avantaggiato, V., Di, Bonito M., Vaccarino, F. M., Michaud, J., and Simeone, A. (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev.* 13: 2787-2800.
- Avantaggiato, V., Pandolfi, P. P., Ruthardt, M., Hawe, N., Acampora, D., Pelicci, P. G., and Simeone, A. (1995) Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J. Neurosci.* 15: 4927-4942.
- Blazejczyk, M., Miron, M., and Nadon, R. (2007) FlexArray: A statistical data analysis software for gene expression microarrays. Genome Quebec, Montreal, Canada. <http://genomequebec.mcgill.ca/flexarray>.
- Blechman, J., Borodovsky, N., Eisenberg, M., Nabel-Rosen, H., Grimm, J., and Levkowitz, G. (2007) Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein Orthopedia. *Development* 134: 4417-4426.
- Bonaventure, P., Guo, H., Tian, B., Liu, X., Bittner, A., Roland, B., Salunga, R., Ma, X. J., Kamme, F., Meurers, B., Bakker, M., Jurzak, M., Leysen, J. E., and Erlander, M. G. (2002) Nuclei and subnuclei gene expression profiling in mammalian brain. *Brain Res.* 943: 38-47.
- Caqueret, A., Boucher, F., and Michaud, J. L. (2006) Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. *Dev. Biol.* 298: 95-106.
- Caqueret, A., Coumailleau, P., and Michaud, J. L. (2005) Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo. *Dev. Dyn.* 233: 652-658.
- Fan, C. M., Kuwana, E., Bulfone, A., Fletcher, C. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Crews, S., Martinez, S., Puellas, L., Rubenstein, J. L., and Tessier-Lavigne, M. (1996) Expression patterns of two murine homologs of *Drosophila* single-

mind suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Mol. Cell Neurosci.* 7: 1-16.

Goshu, E., Jin, H., Lovejoy, J., Marion, J. F., Michaud, J. L., and Fan, C. M. (2004) Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol. Endocrinol.* 18: 1251-1262.

Kirby, J., Heath, P. R., Shaw, P. J., and Hamdy, F. C. (2007) Gene expression assays. *Adv. Clin. Chem.* 44: 247-292.

Lockhart, D. J. and Barlow, C. (2001) Expressing what's on your mind: DNA arrays and the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 63-68.

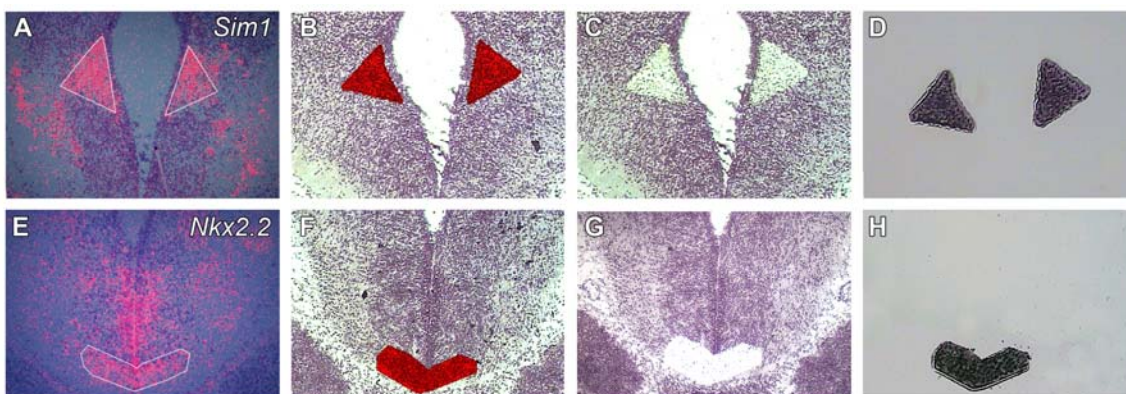
Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R., and Fan, C. M. (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 12: 3264-3275.

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

Paulsen, S. J., Larsen, L. K., Jelsing, J., Janssen, U., Gerstmayer, B., and Vrang, N. (2009) Gene expression profiling of individual hypothalamic nuclei from single animals using laser capture microdissection and microarrays. *J. Neurosci. Methods* 177: 87-93.

Theodorakis, K., Kyriakopoulou, K., Wassef, M., and Karagogeos, D. (2002) Novel sites of expression of the bHLH gene NSCL1 in the developing nervous system. *Gene Expr. Patterns.* 2: 105-108.

Wright, G. W. and Simon, R. M. (2003) A random variance model for detection of differential gene expression in small microarray experiments. *Bioinformatics.* 19: 2448-2455.



I

	# de gènes spécifiques au PVN	# de gènes spécifiques au ARC
Régulateurs de la transcription	34	76
Développement du SNC	9	11
Facteurs de croissance	3	18
Hormone - Neuropeptide	3	6
Composants voies de signalisation	42	55
Transporteurs	7	30
Processus métaboliques	13	55
Adhésion, jonction cellulaire, protéines transmembranaires	15	71
Cycle cellulaire, prolifération, réparation de l'ADN	2	20
Modifications protéiques, recyclage et repliement	11	35
divers	3	21
Fonctions non caractérisées	92	72
Grand total	234	470

J

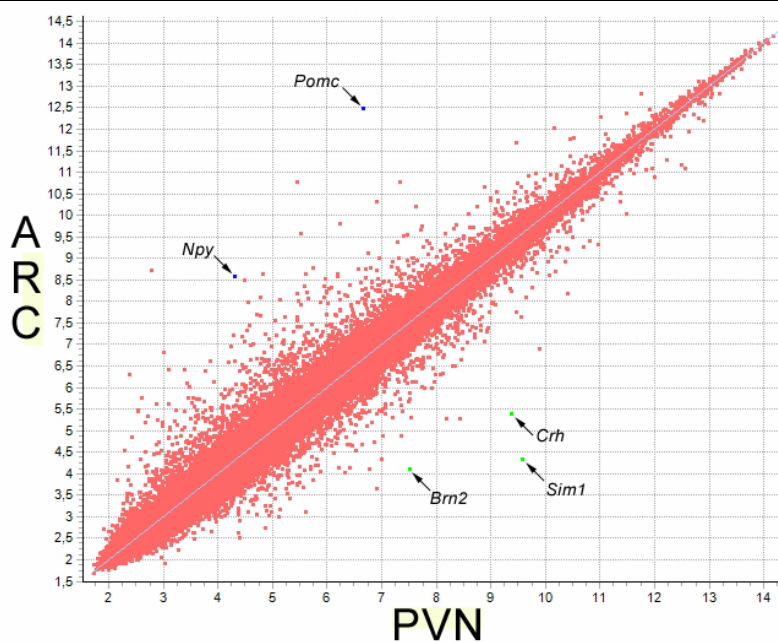


Figure 1.

Figure 1. Analyse du transcriptome du PVN et de l'hypothalamus médiobasal. A-H, Approche de microdissection au laser pour prélever le PVN et l'ARC. (A, E) Les sondes *Sim1* et *Nkx2.1* marquent respectivement le PVN et l'hypothalamus médiobasal. (B, F) En rouge, région sélectionnée pour être prélevée par microdissection au laser selon les patrons d'hybridation de *Sim1* ou *Nkx2.1* identifiés sur une coupe adjacente (A et E). (C, G) Résultantes de la coupe microdisséquée au laser, les régions sélectionnées en (B et F) ont été prélevées sur un *macro-cap* (D, H). (I) Tableau représentant le nombre de gènes classés selon différentes catégories et qui sont spécifiques au PVN ou à l'ARC. (J) Graphique à nuage de points illustrant l'expression des 39 000 transcrits représentés sur la micropuce MOE 430 2.0 d'Affymetrix. Ce graphique montre l'expression moyenne de chaque transcrit pour les 2 micropuces caractéristiques au PVN par rapport aux 2 micropuces caractéristiques à l'ARC. Noter que *Brn2*, *Sim1* et *Crh* sont les gènes avec le plus haut niveau d'expression pour le PVN alors que *Npy* et *Pomc* sont parmi les gènes les plus fortement représentés dans l'ARC.

Tableau 1. Facteurs de transcription, régulateurs du développement du système nerveux et hormones exprimés spécifiquement au sein du PVN en développement d'embryons de souris à E14.5.

N° d'accension Genbank	Gène et description	Niveau expression PVN/ARC
Régulateurs de la transcription		
NM_011376	Single-minded homolog 1 (Drosophila) (<i>Sim1</i>)	37,0
AK020487	POU domain, class 3, transcription factor 2 (<i>Brn2</i>)	10,3
BB180869	Transcribed locus(insulinoma-associated 2) (<i>Insm2</i>)	9,66
AB038696	oligodendrocyte transcription factor 1 (<i>Olig1</i>)	7,59
AB038697	oligodendrocyte transcription factor 2 (<i>Olig2</i>)	5,37
BG073535	Zinc finger protein 804A (<i>Zfp804a</i>)	4,36
BB732077	Zinc finger protein of the cerebellum 3 (<i>Zic3</i>)	4,31
NM_009107	Retinoid X receptor gamma (<i>Rxrg</i>)	3,89
AA419994	Zinc finger and BTB domain containing 16 (<i>Zbtb16</i>)	3,85
NM_021324	Tweety homolog 1 (Drosophila) (<i>Tyhl1</i>)	3,52
AV347235	Suppression of tumorigenicity 18 (<i>St18</i>)	3,35
NM_009501	Ventral anterior homeobox containing gene 1 (<i>Vax1</i>)	3,17
NM_080433	Fez family zinc finger 2 (<i>Fezf2</i>)	3,16
BG072053	Nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1 (<i>Nr2e1</i>)	3,13
NM_134163	Muscleblind-like 3 (Drosophila) (<i>Mbnl3</i>)	2,99
NM_010351	Goosecoid (<i>Gsc</i>)	2,80
NM_010916	Nescient helix loop helix 1 (<i>Nhlh1</i>)	2,77
BB726544	DMRT-like family B with proline-rich C-terminal, 1 (<i>Dmrtb1</i>)	2,66
AK014058	Early B-cell factor 3 (<i>Ebf3</i>)	2,63
BB092799	Nuclear factor I/B (<i>Nfib</i>)	2,62
BB451090	Runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (<i>Runx1t1</i>)	2,61
NM_021560	Basic helix-loop-helix domain containing, class B5 (<i>Bhlhb5</i>)	2,60
BB022640	Tripartite motif-containing 66 (<i>Trim66</i>)	2,57
BB022571	Kruppel-like factor 14 (<i>Klf14</i>)	2,50
NM_010919	NK2 transcription factor related, locus 2 (Drosophila) (<i>Nkx2.2</i>)	2,50
BB453909	Nuclear factor I/A (<i>Nfia</i>)	2,49
BM116592	Neurogenic differentiation 1 (<i>Neurod1</i>)	2,43
BB662927	Forkhead box D1 (<i>Foxd1</i>)	2,39
BB308952	Zinc finger and BTB domain containing 20 (<i>Zbtb20</i>)	2,32
NM_033605	Dachshund 2 (Drosophila) (<i>Dach2</i>)	2,28
AV031691	Zinc finger protein of the cerebellum 1 (<i>Zic1</i>)	2,25
BB804965	Expressed sequence AW049604	2,08
BB732439	Zinc finger protein 536 (<i>Zfp536</i>)	2,07
NM_008499	LIM homeobox protein 5 (<i>Lhx5</i>)	2,02
Développement du système nerveux		
AF442824	Olfactomedin 3 (<i>Olfm3</i>)	3,24
BE947032	Kelch-like 1 (Drosophila) (<i>Klhl1</i>)	3,10
NM_021272	Fatty acid binding protein 7, brain (<i>Fabp7</i>)	2,90
AV332442	Leucine-rich repeat LGI family, member 1 (<i>Lgi1</i>)	2,86
AW060288	Quaking (<i>Qk</i>)	2,85
BB105998	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B) (<i>Elavl2</i>)	2,49
AK003046	Neuritin 1 (<i>Nrn1</i>)	2,26
BB801134	Semaphorin 5B (<i>Sema5b</i>)	2,18
AK005771	Park2 co-regulated (<i>Pacrg</i>)	2,11

N° d'accèsion Genbank	Gène et description	Niveau expression PVN/ARC
Hormones - Neuropeptides		
BM933756	Corticotropin releasing hormone (<i>Crh</i>)	16,4
BB253137	Inhibin beta-B (<i>Inhbb</i>)	2,45
NM_010253	Galanin (<i>Gal</i>)	2,23

Les tableaux 1 et 2 présentent les résultats d'expression pour 46 gènes spécifiquement exprimés au sein du PVN et 93 gènes spécifiquement exprimés au sein de l'ARC. Ces gènes sont soit des régulateurs de la transcription, du développement du système nerveux ou des hormones/neuropeptides. Ces gènes sont ressortis de l'analyse des résultats des expériences de micropuces après traitement avec la méthode de normalisation RMA et la méthode statistique Empirical Bayes. L'expression de ces gènes est exprimée selon le ratio de leur expression dans le PVN vs l'ARC ou vice versa avec un ratio minimum de 2.

Tableau 2. Facteurs de transcription, régulateurs du développement du système nerveux et hormones spécifiquement exprimés au sein de l'ARC en développement d'embryons de souris à E14.5.

N° d'accension Genbank	Gène et description	Niveau expression ARC/PVN
Régulateurs de la transcription		
AF050130	Sine oculis-related homeobox 6 homolog (<i>Six6</i>)	60,3
AB000490	Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 (<i>Nr5a1</i>)	16,5
NM_007430	Nuclear receptor subfamily 0 group B member 1 (<i>Nr0b1</i>)	15,6
BB175494	Transcription factor 7-like 2 (<i>Tcf7l2</i>)	8,43
NM_011547	Transcription factor AP-2, alpha (<i>Tcfap2a</i>)	5,94
AF302127	Receptor-interacting serine-threonine kinase 4 (<i>Ripk4</i>)	5,74
AV237028	Transcription factor AP-2, beta (<i>Tcfap2b</i>)	5,62
BB728182	T-box 3 (<i>Tbx3</i>)	5,25
NM_011641	Transformation related protein 63 (<i>Trp63</i>)	4,81
BC004783	Grainyhead-like 2 (Drosophila) (<i>Grhl2</i>)	4,34
NM_016851	Interferon regulatory factor 6 (<i>Irf6</i>)	3,93
D14636	Runt related transcription factor 2 (<i>Runx2</i>)	3,93
NM_021399	B-cell leukemia/lymphoma 11B (<i>Bcl11b</i>)	3,90
BB104560	Special AT-rich sequence binding protein 2 (<i>Satb2</i>)	3,85
NM_010449	Homeo box A1 (<i>Hoxa1</i>)	3,65
AV026617	FBJ osteosarcoma oncogene (<i>Fos</i>)	3,62
BC012424	E74-like factor 5 (<i>Elf5</i>)	3,58
NM_138953	Elongation factor RNA polymerase II 2 (<i>Ell2</i>)	3,54
AW489260	Ankyrin repeat domain 34B (<i>Ankrd34b</i>)	3,53
NM_008091	GATA binding protein 3 (<i>Gata3</i>)	3,51
BC013080	Grainyhead-like 1 (Drosophila) (<i>Grhl1</i>)	3,43
AV335209	LIM homeobox protein 1 (<i>Lhx1</i>)	3,33
AK014811	Six6 opposite strand transcript 1 (<i>Six6os1</i>)	3,30
BB104635	LIM homeobox protein 9 (<i>Lhx9</i>)	3,26
AF295369	Iroquois related homeobox 2 (<i>Irx2</i>)	3,23
U65091	Cbp/p300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 1 (<i>Cited1</i>)	3,20
U88064	Basonuclin 1 (<i>Bnc1</i>)	3,17
U49641	Fibroblast growth factor binding protein 1 (<i>Fgfbp1</i>)	3,10
AF421891	Transcription factor AP-2, delta (<i>Tcfap2d</i>)	3,09
D49658	LIM homeobox protein 8 (<i>Lhx8</i>)	3,07
NM_018885	Iroquois related homeobox 4 (<i>Irx4</i>)	2,99
AV231424	Grainyhead-like 3 (Drosophila) (<i>Grhl3</i>)	2,91
BI465857	Kruppel-like factor 5 (<i>Klf5</i>)	2,91
BG065255	POU domain, class 3, transcription factor 1 (<i>Pou3f1</i>)	2,90
BB230894	BTB (POZ) domain containing 11 (<i>Btbd11</i>)	2,87
BB482899	Basonuclin 2 (<i>Bnc2</i>)	2,86
BG072869	Empty spiracles homolog 2 (<i>Emx2</i>)	2,84
AI509029	Sine oculis-related homeobox 3 homolog (<i>Six3</i>)	2,80
BG143502	Ras responsive element binding protein 1 (<i>Rreb1</i>)	2,80
AA051236	Homeo box C5 (<i>Hoxc5</i>)	2,75
BB550860	Transcription factor AP-2, gamma (<i>Tcfap2c</i>)	2,72
AV025472	Kruppel-like factor 6 (<i>Klf6</i>)	2,70
AV028445	BTB (POZ) domain containing 3 (<i>Btbd3</i>)	2,63
NM_016861	PDZ and LIM domain 1 (<i>Pdlim1</i>)	2,62

N° d'accèsion Genbank	Gène et description	Niveau expression ARC/PVN
NM_018826	Iroquois related homeobox 5 (<i>Irx5</i>)	2,60
BG066866	Vestigial like 3 (<i>Vgll3</i>)	2,52
BQ126004	Zinc finger, CCHC domain containing 5 (<i>Zcchc5</i>)	2,52
AV044715	Transcription factor-like 5 (<i>Tcfl5</i>)	2,43
BB149026	Progesterone receptor (<i>Pgr</i>)	2,41
NM_026190	Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (<i>Polr3g</i>)	2,36
AI893638	Sine oculis-related homeobox 4 homolog (<i>Six4</i>)	2,35
AI646838	Estrogen receptor 1 (alpha) (<i>Esr1</i>)	2,31
NM_009332	Transcription factor 3 (<i>Tcf3</i>)	2,29
AI325341	BarH-like homeobox 1 (<i>Barx1</i>)	2,28
D83147	Sine oculis-related homeobox 2 homolog (Drosophila) (<i>Six2</i>)	2,26
BB331017	SRY-box containing gene 1 (<i>Sox1</i>)	2,25
BB760085	Eyes absent 1 homolog (Drosophila) (<i>Eya1</i>)	2,23
NM_010467	Homeo box D1 (<i>Hoxd1</i>)	2,23
BB363812	Eyes absent 4 homolog (Drosophila) (<i>Eya4</i>)	2,21
BI076816	Zinc finger protein 458 (<i>Zfp458</i>)	2,19
BB555654	Friend leukemia integration 1 (<i>Fli1</i>)	2,19
BM245170	Fos-like antigen 2 /// similar to fos-like antigen 2 (<i>Fosl2</i>)	2,18
NM_009883	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta (<i>Cebpb</i>)	2,17
BE989096	Aryl-hydrocarbon receptor (<i>Ahr</i>)	2,17
X58380	High mobility group AT-hook 2 (<i>Hmga2</i>)	2,09
BB021019	Mohawk (<i>Mkx</i>)	2,08
AV322952	Forkhead box P2 (<i>Foxp2</i>)	2,07
BM230508	Zinc finger protein 750 (<i>Zfp750</i>)	2,07
AK007959	Kruppel-like factor 3 (basic) (<i>Klf3b</i>)	2,06
NM_021300	Reproductive homeobox 4B /4E/4C/4H/4G (<i>Rhox4b/4e/4h/4g</i>)	2,06
BI714076	Zinc finger protein 451 (<i>Zfp451</i>)	2,03
AF224264	Fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (<i>Fus</i>)	2,02
BB051738	Paired related homeobox 1 (<i>Prrx1</i>)	2,02
NM_133229	Ripply3 homolog zebrafish (<i>Ripply3</i>)	2,01
M88489	Replication factor C (activator 1) 1 (<i>Rfc1</i>)	2,01
AW536705	Suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae) (<i>Supt16h</i>)	2,00
Développement du système nerveux		
BF471533	Ret proto-oncogene (<i>Ret</i>)	4,81
NM_021477	Ataxin 2 binding protein 1 (<i>A2bp1</i>)	3,33
BB768495	Proteolipid protein (myelin) 1 (<i>Plp1</i>)	2,94
AI839535	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 2 (<i>Mdga2</i>)	2,60
BB516668	Protein kinase, cGMP-dependent, type I (<i>Prkg1</i>)	2,51
M63801	Gap junction membrane channel protein alpha 1 (<i>Gjal</i>)	2,39
AV256403	Semaphorin 4D (<i>Sema4d</i>)	2,20
AV309418	N-myc downstream regulated gene 1 (<i>Ndrgl</i>)	2,16
AV348197	Semaphorin 3E (<i>Sema3e</i>)	2,10
BB499147	Semaphorin 3D (<i>Semad</i>)	2,02
Hormones - Neuropeptides		
AV173741	Pro-opiomelanocortin-alpha (<i>Pomc</i>)	49,4
NM_023456	Neuropeptide Y (<i>Npy</i>)	17,4
NM_009215	Somatostatin (<i>Ss</i>)	6,83
M13227	Preproenkephalin 1 (<i>Penkl</i>)	2,80

N° d'accèsion Genbank	Gène et description	Niveau expression ARC/PVN
NM_024435	Neurotensin (<i>Nts</i>)	2,06
NM_007427	Agouti related protein (<i>Agrp</i>)	2,01

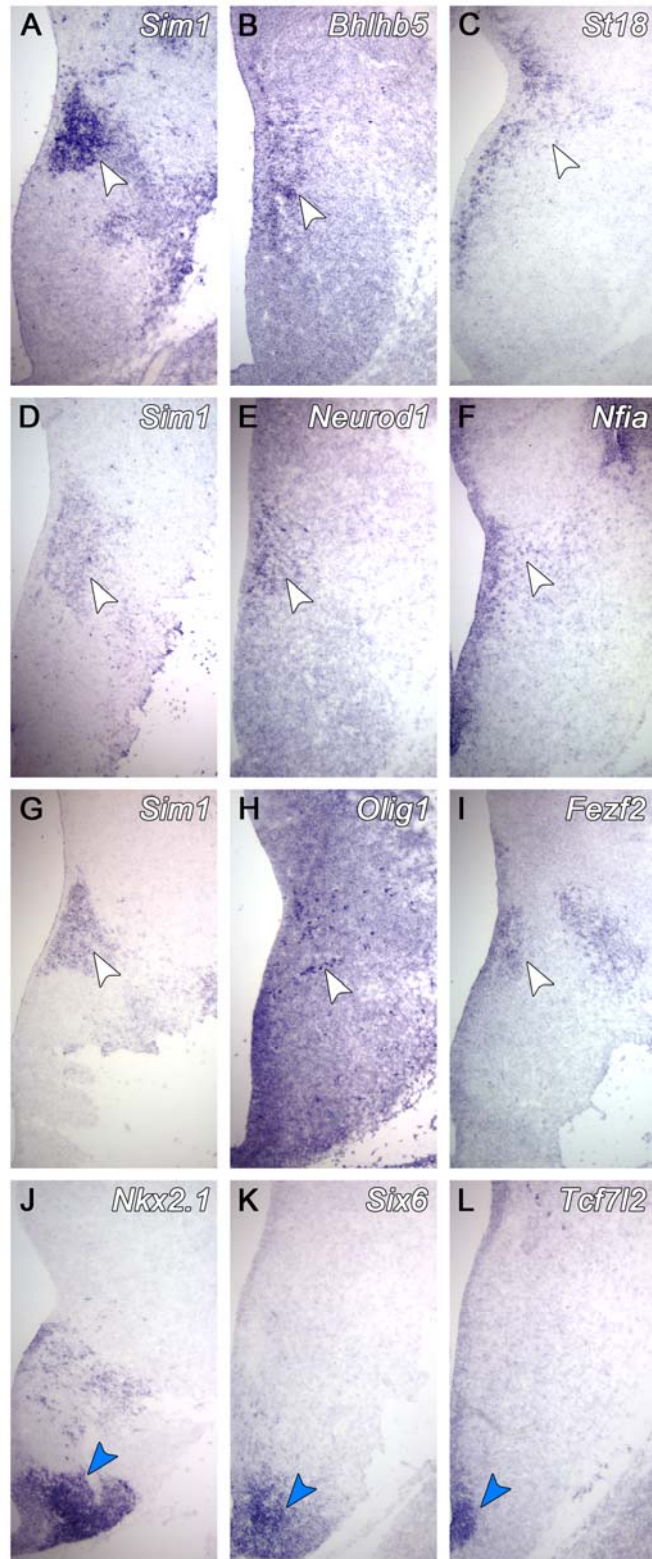


Figure 2.

Figure 2. Validation des résultats des micropuces par hybridation *in situ*. Sections coronales sur des embryons de souris de type sauvage à E14.5 hybridées avec des sondes contre des facteurs de transcription spécifiques au PVN (A-I) ou spécifiques à l'ARC (J-L). La sonde *Sim1* (A, D, G) définit le territoire couvert par le PVN alors que la sonde *Nkx2.1* (J) marque spécifiquement l'hypothalamus médiobasal. Les flèches blanches (PVN) ou bleues (ARC) montrent les patrons d'expression des différents gènes au sein de ces noyaux hypothalamiques.

CHAPITRE VI: Intégration des différents facteurs de transcription spécifiques au PVN.

Tableau 1. Gènes analysés par hybridation *in situ*.

Gènes	Source d'identification	Catégorie d'expression	Expression chez embryon <i>Sim1</i> ^{-/-}
<i>Alcam</i>	ME12,5	2	↓
<i>bHLHb5</i>	ME12,5 [†] , ME14,5	3	ND
<i>bHLHb9</i>	ME12,5 [†]	2	ND
<i>Brn2</i>	L	1	↓
<i>Brn4</i>	L	2	x
<i>Cart</i>	ME12,5	2	↓
<i>Cbln1</i>	ME12,5	2	↓
<i>Eyal</i>	MCC	x	x
<i>Fezf2</i>	ME14,5	PVN	ND
<i>Foxd1</i>	ME12,5 [†]	V	ND
<i>FoxG1</i>	ME12,5 [†]	3	ND
<i>FoxJ2</i>	ME12,5 [†]	x	ND
<i>FoxJ3</i>	ME12,5 [†]	x	ND
<i>FoxK1</i>	ME12,5 [†]	x	ND
<i>Foxk2</i>	ME12,5 [†]	x	ND
<i>Foxo3A</i>	ME12,5 [†]	x	ND
<i>FoxP1</i>	ME12,5 [†]	2	ND
<i>FoxP2</i>	ME12,5 [†]	2	ND
<i>Gata2</i>	MCC	x	x
<i>Gli3</i>	L	V	ND
<i>Irx3</i>	ME12,5	x	↑
<i>Irx5</i>	ME12,5*	x	↑
<i>Ldb2</i>	ME12,5; MCC	2	↓
<i>Lgi2</i>	MCC	x	x
<i>Lhx1</i>	ME12,5*	2	x
<i>Lhx2</i>	ME12,5*	3	x
<i>Lhx5</i>	ME12,5 [†] , ME14,5	3	x
<i>Lhx8</i>	MCC	x	x
<i>Lhx9</i>	ME12,5*	x	x
<i>Lnx1</i>	ME12,5*	x	ND
<i>Lnx2</i>	ME12,5*	x	ND
<i>Lnx3</i>	ME12,5*	x	ND
<i>Lnx4</i>	ME12,5	3	↓
<i>Mgrn1</i>	ME12,5	x	x
<i>Necdin</i>	L	3	x
<i>Neurod1</i>	ME12,5 [†] , ME14,5	1 + PVN	x
<i>Neurod6</i>	ME12,5	2	↓
<i>Nfia</i>	ME14,5	PVN	ND
<i>Ngn3</i>	L	x	x
<i>Nkx2.1</i>	L	ARC	ND

Gènes	Source d'identification	Catégorie d'expression	Expression chez embryon <i>Sim1</i> ^{-/-}
<i>Nkx2.2</i>	L, ME14,5	1	x
<i>Nkx6.2</i>	MCC	x	x
<i>Notch</i>	L	x	x
<i>Olig1</i>	ME14,5	PVn	ND
<i>Otp</i>	L	3	x
<i>Phd1</i>	L	3	x
<i>Plzf</i>	L	2	x
<i>Rgs4</i>	ME12,5	2	↓
<i>Ror alpha</i>	ME12,5	x	x
<i>Rxr gamma</i>	ME12,5	3	↓
<i>Sax1</i>	ME12,5	x	↑
<i>Sim1</i>	L	3	-
<i>Six6</i>	ME14,5	ARC	ND
<i>Sox10</i>	MCC	x	x
<i>Sox3</i>	L	1	↓
<i>St18</i>	ME14,5	PVN	ND
<i>Tcf7l2</i>	ME14,5	ARC	ND
<i>Trh</i>	ME12,5 et L	2	↓
<i>Unc13C</i>	ME12,5	2	↓
<i>Wnt7b</i>	L	V	x

Ce tableau représente les patrons d'expression de différents gènes étudiés par hybridation *in situ*. Ces gènes ont été identifiés soit par la littérature (L), l'analyse des expériences de micropuce à E12.5 (ME12,5), comme étant des gènes fortement exprimés dans l'hypothalamus antérieur à E12.5 (ME12,5[†]) ou faisant partie de la même famille que des gènes identifiés par les expériences de micropuce à E12,5 (ME12,5*) ou encore comme des gènes identifiés par les expériences de micropuce à E14,5 (ME14,5). Le patron d'expression a été défini en plusieurs catégories : (1) gènes exprimés dans le domaine médial de l'hypothalamus antérieur à E12,5; (2) gènes exprimés dans le domaine latéral de l'hypothalamus antérieur à E12,5; (3) gènes exprimés dans les domaines médial et latéral de l'hypothalamus antérieur à E12,5; (V) gènes exprimés dans la région ventriculaire de l'hypothalamus antérieur à E12,5; (PVN) gènes exprimés dans le PVN prospectif à E14,5; (ARC) gènes exprimés dans l'hypothalamus médiobasal à E14,5. Le patron d'expression de certains de ces gènes a aussi été étudié chez les embryons *Sim1*^{-/-}, leur niveau d'expression chez ces mutants se définit comme

(↓) étant diminué, (↑) étant augmenté, (x) étant non affecté ou non présent, (ND) étant non disponible.

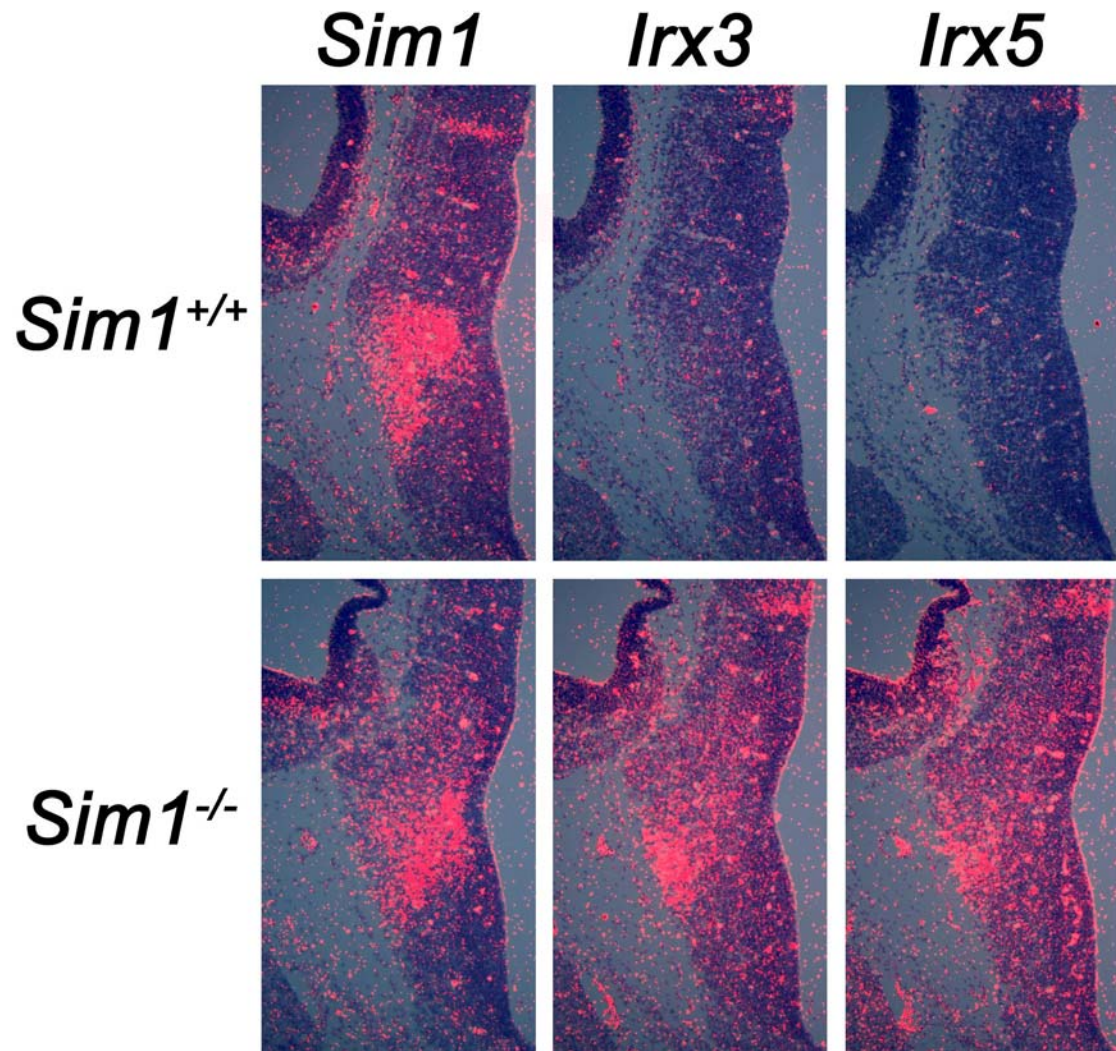


Figure 1.

Figure 1. Expression d'*Irx3* et *Irx5* dans l'hypothalamus antérieur à E12.5 d'embryons de souris *Sim1*^{+/+} et *Sim1*^{-/-}. La perte d'expression de *Sim1* chez les embryons *Sim1*^{-/-} résulte en une surexpression d'*Irx3* et *Irx5* au sein de l'hypothalamus antérieur.

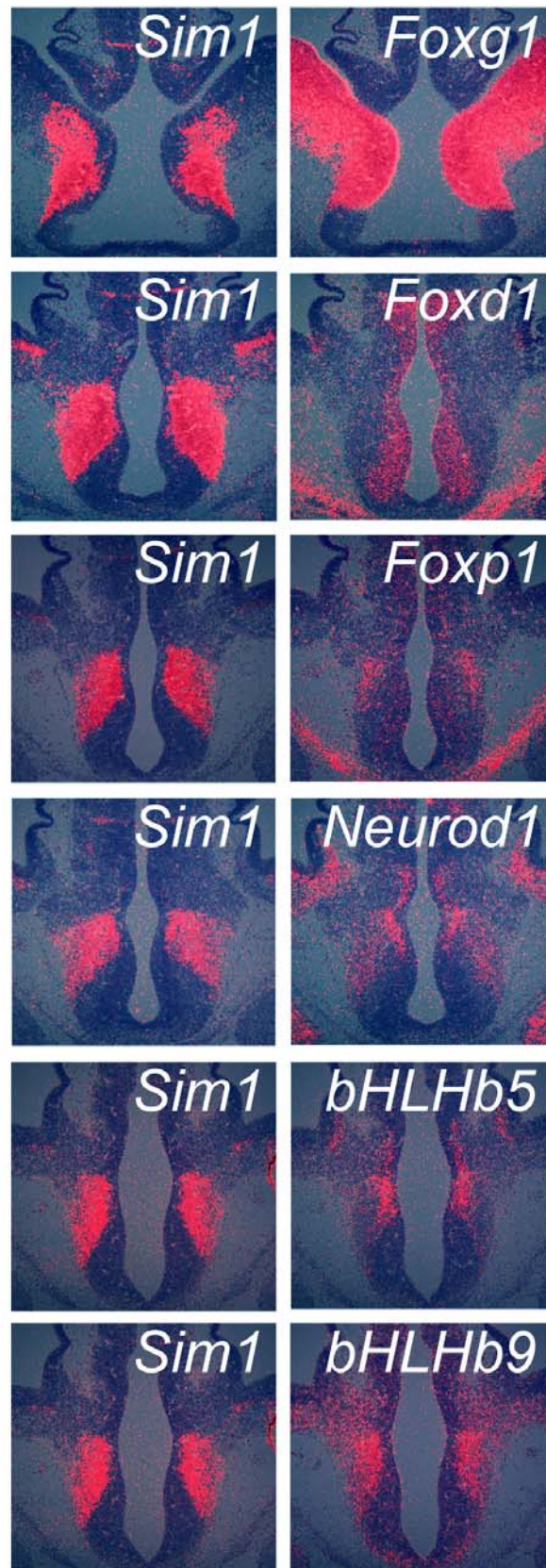
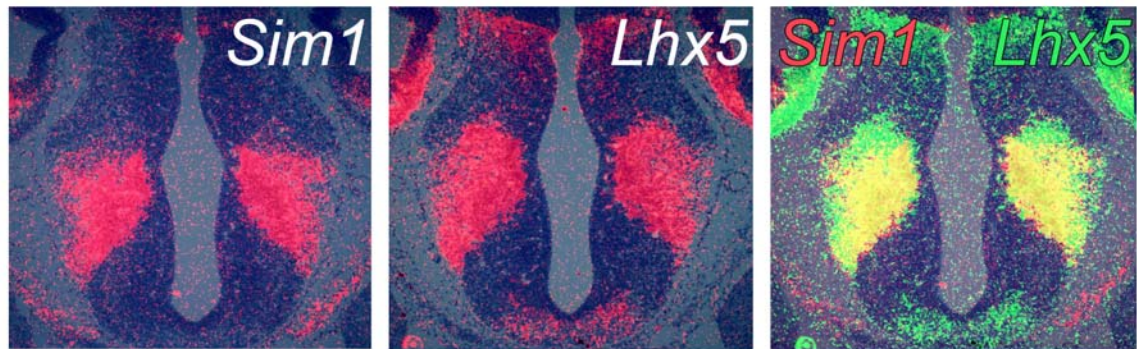


Figure 2.

Figure2. Patrons d'expression, étudiés par hybridation *in situ*, de différents gènes au sein de l'hypothalamus antérieur à E12.5. Ces gènes ont été identifiés comme étant fortement exprimés dans l'hypothalamus antérieur de souris de type sauvage à E12.5 via une approche de micropuce. De plus, *Bhlhb5* et *Neurod1* ont aussi été identifiés comme étant spécifiquement exprimés au sein du PVN prospectif à E14.5 via une deuxième approche de micropuce. Noter que tous ces gènes chevauchent à une plus ou moins grande échelle le patron d'expression de *Sim1*.

A)



B)

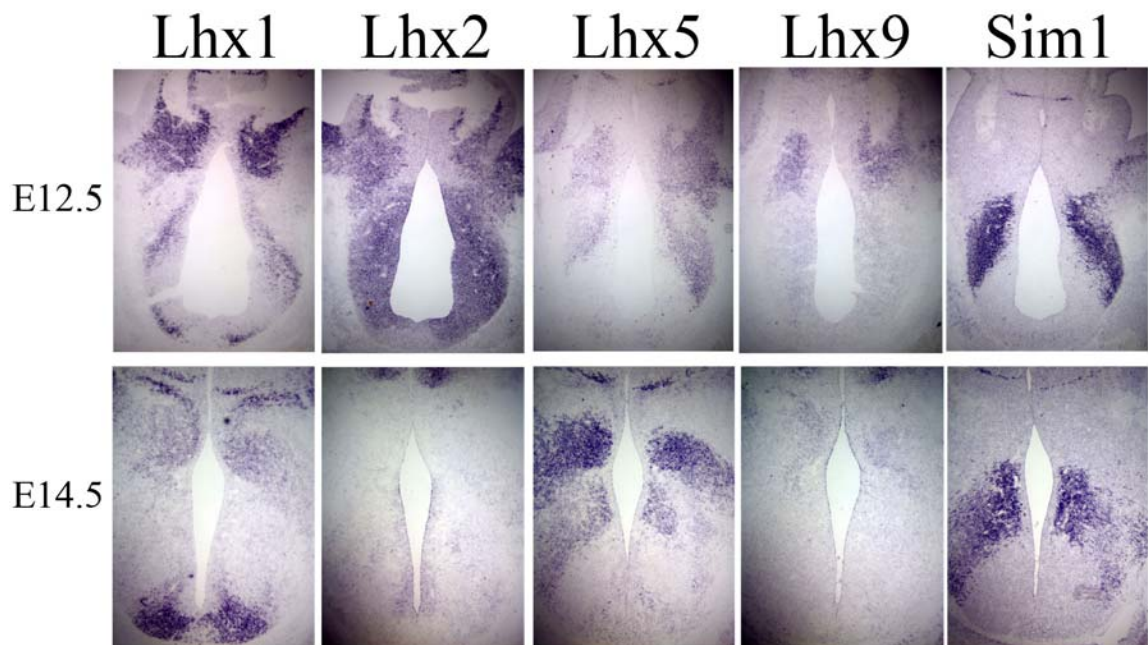


Figure 3.

Figure 3. Patron d'expression des gènes de la famille *Lhx* dans l'hypothalamus antérieur à E12.5 et E14.5. A) Le gène *Lhx5* a été identifié comme étant fortement exprimé dans l'hypothalamus antérieur de souris de type sauvage à E12.5 via une approche de micropuce. Il a également été identifié comme étant spécifiquement exprimé au sein du PVN prospectif à E14.5 via une deuxième approche de micropuce. Ce gène a un patron d'expression qui colocalise presque parfaitement avec celui de *Sim1*. B) Étude des patrons d'expression de gènes appartenant à la même famille que *Lhx5* au sein du PVN en développement à E12.5 et E 14.5. *Lhx1*, *Lhx2* et *Lhx5* chevauchent en partie le patron d'expression de *Sim1* à E12.5. A E14.5, seul *Lhx5* est encore exprimé dans une région chevauchant le patron d'expression de *Sim1*.

CHAPITRE VII: Discussion

L'importance d'une cascade de facteurs de transcription pour assurer le développement du PVN.

Conservation de la cascade entre espèces.

Les différentes études de perte de fonction chez la souris ont été essentielles pour identifier une cascade de facteurs de transcription responsable de la différenciation cellulaire au sein du PVN et du SON. Ces différentes études ont permis d'établir les relations entre les différents gènes impliqués dans ce processus en plus de fournir un schéma de travail pour parfaire l'exploration du développement de ces régions. En effet, l'analyse des phénotypes des souris homozygotes pour un allèle nul de *Sim1*, *Arnt2* ou *Otp* a démontré que ces trois gènes sont absolument requis pour le développement du PVN et du SON. De manière similaire, l'étude de la perte de fonction des gènes *Sim2* et *Brn2* a établi que ces deux gènes agissent en aval des 3 autres et sont requis pour la différenciation de types cellulaires distincts. De manière intéressante, les études réalisées chez le poisson zèbre ont permis de démontrer que la fonction de *Sim1*, *Otp* et *Arnt2* dans le développement hypothalamique est conservée entre les espèces. De plus, l'expression de *Sim1* n'est pas affectée par *Otp* et l'expression d'*Otp* n'est pas affectée par *Sim1* chez le poisson-zèbre (Eaton, J. L. and Glasgow, E. 2007). Donc tout comme chez la souris, ces deux gènes agissent en parallèle pour permettre la différenciation cellulaire au sein du PVN. L'ensemble de ces études démontre que *Sim1* et *Otp* sont fonctionnellement conservés entre les mammifères et les poissons. L'importance de ces deux gènes dans le développement neuroendocrinien semble donc être capitale et suggère que leur dysfonction puisse être la cause de pathologies neuroendocriniennes d'origine développementale ou fonctionnelle.

Facteurs agissant en amont de cette cascade.

L'étude du développement du système neuroendocrinien chez le poisson-zèbre a permis d'identifier des gènes agissant en amont de cette cascade et induisant l'expression d'*Otp*. Parmi eux, le gène *Fezl* a été démontré comme étant essentiel au

développement des neurones à isotocine chez le poisson-zèbre (Blechman, J. et al. 2007). Ce facteur de transcription semble réguler la différenciation de ce type cellulaire par l'intermédiaire d'*Otp*. Il serait alors intéressant d'évaluer l'impact de la perte ou du gain de fonction de ce gène au cours du développement du PVN chez les mammifères. Nous avons étudié le profil d'expression de ce gène au sein du PVN à E14.5 (voir chapitre V, Fig. 2). De manière intéressante, ce dernier est exprimé dans la partie médiale du PVN médian-postérieur, un patron d'expression qui ressemble beaucoup à celui de *Brn2* au même stade. Il se peut donc que ce gène ait conservé son implication dans la différenciation des cellules à OT chez la souris, reste à savoir si sa fonction passerait par *Otp* ou si *Fezl* agirait en aval de ce dernier et de *Brn2*.

Caractérisation de la région promotrice d'Otp.

Nous avons étudié, via une approche bioinformatique, la région promotrice d'*Otp* chez la souris afin d'identifier des régulateurs potentiels de son expression. Aucun site de liaison potentiel pour *Fezl* a été identifié au sein de cette région, laissant suggérer sans toutefois le prouver que *Fezl* ne régule peut-être pas directement l'expression d'*Otp* chez les mammifères. L'action de *Fezl* sur *Otp* pourrait alors passer par des effecteurs intermédiaires ou encore n'être pas conservée. Toutefois, cette analyse nous a permis de démontrer l'existence de trois blocs de séquences ultraconservés entre les génomes de l'homme, de la souris, du poisson-zèbre et du poulet (voir chapitre IV) sur 7 Kb en amont du site d'initiation de la transcription d'*Otp*. Nous avons créé un transgène composé de ces 7 Kb de séquence suivis du gène rapporteur β -galactosidase. Ceci nous a permis de démontrer par transgénèse transitoire chez la souris que cette séquence de 7 Kb est suffisante pour permettre une expression spécifique du gène rapporteur au sein du PVN prospectif en développement (voir chapitre IV, Fig. 2). Cet élément utilisé en transgénèse se révèle donc un outil critique pour la dissection du programme développemental de l'hypothalamus. Il permettra en effet de répondre de manière spécifique à plusieurs questions notamment sur la fonction de *Brn2* au cours du développement hypothalamique à savoir si ce gène est suffisant pour le développement des cellules OT, AVP ou CRH et si *Sim1* agit uniquement via BRN2 pour le

développement de ces cellules. Finalement, cet élément pourra être utilisé pour générer d'autres transgènes, surexprimant des gènes candidats, et pour répondre à des questions d'intérêt concernant leur rôle au cours du développement du PVN.

Convergence des voies, relations entre les différents effecteurs de cette cascade.

Sim1 et Otp sont requis pour la différenciation et la migration des neurones peuplant le PVN et le SON.

Chez les souris homozygotes pour un allèle nul de *Sim1*, *Arnt2* ou *Otp*, les cellules du PVN et du SON sont générées mais ne se différencient jamais de manière terminale. L'étude des souris mutantes pour *Otp* a démontré que ce dernier joue un rôle à la fois dans la prolifération, la migration et la différenciation de ces cellules. Quant à *Sim1*, il est requis également pour la différenciation de ces neurones (Michaud, J. L. et al. 1998). De plus, les cellules neuroendocriniennes peuplant le PVN et le SON ont un patron de migration anormal chez les souris mutantes pour *Sim1* (Caqueret, A. et al. 2006; Xu, C. and Fan, C. M. 2007). La *PlexinC1*, une molécule de guidance, agissant en aval de *Sim1* semble être en partie responsable de ce phénotype (Xu, C. and Fan, C. M. 2007). Il serait alors intéressant de voir si l'effet d'*Otp* sur la migration des neurones postmitotiques passe également par l'entremise de ce gène.

Sim1 et Otp sont également impliqués dans la prolifération des neurones peuplant le PVN et le SON.

Notre étude de prolifération cellulaire chez les souris mutantes pour *Sim1* semble suggérer que ce dernier soit aussi impliqué dans la prolifération cellulaire des neurones du PVN/SON (Caqueret, A. et al. 2006). Cette étude basée sur l'analyse de l'incorporation de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) et le devenir des cellules à long terme montre une réduction de 30% dans le nombre de cellules en prolifération chez l'embryon mutant comparativement à l'embryon de type sauvage. Ce même phénotype

est retrouvé chez les souris mutantes pour *Otp* (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). Toutefois, Xu et Fan qui ont également étudié la prolifération cellulaire chez les embryons mutants pour *Sim1*, n'ont pas identifié de défaut à ce niveau (Xu, C. and Fan, C. M. 2007). Il est à noter que pour cette analyse, ils ont effectué des pulses de BrdU d'une heure et non de 24 ou 48 heures comme nous l'avons fait. De manière intéressante, Acampora et al ont démontré que des pulses d'injection de BrdU d'une heure ne permettait pas d'identifier de défaut de prolifération chez les embryons mutants pour *Otp* (Acampora, D. et al. 1999). A l'inverse, en réalisant des pulses de 24 ou 48 heures ils ont effectivement pu démontrer une diminution du nombre de neurones au niveau du PVN prospectif de ces souris comparativement aux souris de type sauvage. Les différentes approches méthodologiques employées par nous et Xu et Fan semblent donc être à la source de cette différence de résultats. Il est à noter que ni Xu et Fan, ni nous n'avons montré une augmentation de la mort cellulaire au niveau du PVN prospectif, confortant l'idée que la diminution du nombre de cellules peuplant le PVN peut être due soit à un défaut de prolifération ou à un changement de devenir de ces cellules. Finalement, il faut noter que ni *Sim1* ni *Otp* n'agissent sur l'expression de l'autre, démontrant qu'ils fonctionnent tous les deux dans des voies parallèles ayant la même finalité. Ces deux gènes semblent donc assumer toutes les facettes du développement du PVN/SON en agissant de manière parallèle. Un modèle intéressant serait que ces deux gènes agissent au sein d'un même complexe protéique pour réguler l'expression de leurs gènes cibles en se liant aux éléments régulateurs de leur promoteur.

Relation entre Sim1 et Sim2 au cours du développement hypothalamique.

Les facteurs de transcription *Sim1* et *Sim2* appartiennent à la même famille de protéines. De manière intéressante, ils sont tous deux impliqués dans la différenciation cellulaire du PVN (Caqueret, A. et al. 2005b). Toutefois, *Sim1* agit en amont de *Sim2* pour contrôler le développement des neurones à SS et à TRH. La relation entre ces deux gènes est donc hiérarchique mais toutefois complexe. En effet, les souris homozygotes pour un allèle nul de *Sim2* ont une diminution partielle du nombre de cellules à TRH et à SS (Goshu, E. et al. 2004). De plus, en absence de *Sim2*, le dosage

de *Sim1* (homozygote ou hétérozygote) a un impact sur le nombre final de cellules à SS et à TRH (Goshu, E. et al. 2004). *Sim1* a donc la capacité, en plus d'agir en amont de *Sim2*, de compenser partiellement pour sa perte d'expression. Ce phénomène est assez intéressant sachant que *Sim1* et *Sim2* ont des capacités transcriptionnelles différentes dans le sens où *Sim2* est un répresseur de la transcription et où *Sim1* n'a en soi aucune activité transcriptionnelle (Acampora, D. et al. 1999; Moffett, P. and Pelletier, J. 2000; Woods, S. L. and Whitelaw, M. L. 2002). Toutefois selon le contexte cellulaire, ces deux gènes ont la capacité d'agir de manière similaire, par exemple ils sont tous deux capables d'activer l'expression de *Shh* sous le contrôle du promoteur de *Wnt1* dans le mésencéphale de l'embryon de souris (Epstein, D. J. et al. 2000). Par ailleurs, le dosage de *Sim1* et *Sim2* a aussi un impact sur le développement axonal des corps mammillaires (Marion, J. F. et al. 2005, voir chapitre VIII, annexe I). Dans ce contexte, ces deux gènes n'agissent plus dans une hiérarchie mais bel et bien en parallèle où ils semblent compenser pour la perte de l'un ou de l'autre. Tous ces résultats semblent conclure que *Sim1* et *Sim2* peuvent jouer des rôles similaires *in vivo*, même si leur capacité transcriptionnelle est distincte.

Sim2 et *Brn2*, deux facteurs de transcription assurant la différenciation des cinq types cellulaires majeurs composant le PVN/SON.

Au cours du développement du PVN/SON, *Sim1* et *Otp* contrôle la différenciation cellulaire par l'intermédiaire de deux autres facteurs de transcription : *Sim2* et *Brn2*. Ces deux gènes sont quant à eux requis pour la différenciation de types cellulaires distincts. En effet, *Brn2* est nécessaire au développement des neurones magnocellulaires et des neurones parvocellulaires exprimant la CRH alors que *Sim2* est impliqué dans la différenciation des neurones parvocellulaires synthétisant la TRH et la SS. Aux stades précoces du développement du PVN, *Sim2* et *Brn2* sont exprimés dans des domaines distincts. *Sim2* est exprimé antérieurement dans la partie latérale du PVN alors que *Brn2* est exprimé dans la partie médiale du PVN médian-postérieur (Goshu, E. et al. 2004; Schonemann, M. D. et al. 1995). Au sein du PVN, les patrons d'expression distincts de ces deux facteurs de transcription semblent donc assurer la différenciation

des divers types cellulaires spécifiés de manière générale par *Sim1* et *Otp*. De plus, puisque *Brn2* et *Sim2* contribuent à la différenciation de plusieurs types cellulaires distincts, il est fort probable qu'ils réalisent cette tâche par l'intermédiaire d'effecteurs définissant des types cellulaires uniques.

Fonctions de Brn2 au cours du développement du PVN/SON.

Sim1 et *Otp* semblent assurer la différenciation des cellules à OT, AVP et CRH en modulant l'expression de *Brn2*. Au stade initial du développement, *Brn2* est exprimé par tous les progéniteurs du PVN. Son expression est par la suite uniquement maintenue dans les neurones postmitotiques destinés à exprimer l'OT, l'AVP et la CRH. D'ailleurs, *Brn2* n'est pas coexprimé dans les cellules à TRH comme démontré par des études de double-marquage. Certaines expériences laissent suggérer que *Brn2* pourrait réguler l'expression des gènes *Avp*, *Ot* et *Crh*. En effet, dans un contexte cellulaire *Brn2* lie le promoteur de la CRH et en régule l'expression (Schonemann, M. D. et al. 1995). De plus, des essais de protections à la RNase ont démontré que l'expression d'AVP et OT est diminuée de moitié chez les embryons hétérozygotes pour un allèle nul de *Brn2* (Nakai, S. et al. 1995). Même si on ne peut mettre de côté cette facette de la fonction de *Brn2*, il semble plus probable que la perte des cellules à *Ot*, *Avp* et *Crh* chez les embryons de souris *Brn2*^{-/-} soit plus due à un défaut développemental qu'à la perte de régulation de l'expression des gènes *Avp*, *Ot* et *Crh* par *Brn2*. L'ensemble de ces données conduit donc à se poser plusieurs questions sur la fonction de *Brn2* au cours du développement du PVN à savoir s'il est suffisant au développement de neurones à AVP, OT et CRH au détriment des neurones à TRH et si *Brn2* est l'unique médiateur de *Sim1* et *Otp* pour le développement de ces cellules ou si d'autres gènes sont impliqués. L'utilisation d'un transgène permettant une surexpression spécifique au sein du PVN en développement de *Brn2*, sous le contrôle de la région promotrice d'*Otp*, nous permettra de répondre à ce genre de questions. De plus, le croisement de ces souris avec les souris mutantes pour *Sim1* nous permettra de générer des embryons homozygotes pour un allèle nul de *Sim1* mais surexprimant *Brn2* au cours du développement du PVN prospectif. Ceci nous conduira à vérifier si *Brn2* permet le développement des cellules à

OT, AVP et CRH en absence de *Sim1*. Cette expérience nous permettra en effet de démontrer si *Brn2* seul suffit pour récupérer le développement du PVN, du moins le développement des neurones à OT, AVT et CRH.

Établissement du transcriptome du PVN en développement via une approche intégrative.

Établissement du transcriptome à E12.5 et identification des gènes agissant en aval de Sim1.

Notre première approche pour identifier des régulateurs potentiels du développement du PVN a été d'étudier le transcriptome de l'hypothalamus antérieur chez des embryons de souris *Sim1*^{-/-} versus *Sim1*^{+/+}. Cette approche nous a permis d'identifier 56 gènes dont l'expression était modulée par la perte d'expression de *Sim1* (Caqueret, A. et al. 2006). Au sein de ces 56 gènes seuls cinq facteurs de transcription y figuraient – *Irx3*, *Sax1*, *Rxrg*, *Rora* et *Neurod6*. Ces gènes représentent donc des candidats potentiels pour intervenir dans la différenciation des types cellulaires qui peuplent le PVN prospectif. *Irx3* représente d'ailleurs une cible intéressante. Selon les résultats de la micropuce qui ont été validés, *Irx3* est surexprimé en l'absence de *Sim1*. Il se peut donc que pour permettre un développement normal du PVN, l'expression d'*Irx3* doit être réprimée par *Sim1* ou un de ses effecteurs. De manière intéressante, l'expression ectopique d'*Irx3* chez l'embryon de poulet au niveau du préthalamus, situé dorsalement à l'hypothalamus, interfère avec le développement de cette structure en induisant l'expression de gènes caractéristiques au thalamus (Kiecker, C. and Lumsden, A. 2004). Puisqu'*Irx3* et *Irx5* occupe des positions chromosomiques adjacentes, dans le sens où ils sont situés côte à côte sur le chromosome, il est possible qu'ils partagent certains éléments régulateurs communs. Nous avons donc étudié le patron d'expression d'*Irx5* chez les embryons *Sim1*^{-/-} (voir chapitre VI, Fig. 1). Il s'avère que son expression est aussi affectée à la hausse par la perte de *Sim1*. La perte de répression d'*Irx3* et/ou *Irx5* chez les embryons *Sim1*^{-/-} pourrait donc potentiellement contribuer au développement anormal du PVN prospectif. C'est une avenue intéressante qui sera

explorée. A cet effet, un transgène surexprimant *Irx3* sous le contrôle du promoteur spécifique au PVN est en train d'être construit pour établir l'effet de la surexpression d'*Irx3* au cours du développement de ce noyau.

Alcam est un autre gène qui est ressorti au cours de cette analyse. *Alcam* est une molécule d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines qui est impliquée entre autre dans l'extension des neurites (Sato, C. et al. 2002) et la migration au cours de la neurogenèse (Mendis, D. B. et al. 2000). Puisqu'*Alcam* est une molécule d'adhésion impliquée dans la migration neuronale, la perturbation de son expression au cours du développement de l'hypothalamus antérieur pourrait expliquer, du moins en partie, le phénomène de migration anormale des neurones du PVN et SON que l'on retrouve chez les souris *Sim1*^{-/-}. Toutefois, l'analyse du phénotype des souris *Alcam*^{-/-}, offertes par Dr Joshua Weiner (University of Iowa), n'a démontré aucune perturbation du développement du PVN et du SON. *Alcam* occupe potentiellement une autre fonction, à moins qu'il n'en occupe aucune, dans le cadre du développement de ces structures.

Une autre étude que la notre a employé une approche d'analyse de transcriptome différente pour identifier les gènes agissant en aval de *Sim1* dans un contexte où des cellules Neuro2a surexprimées *Sim1* (Liu, C. et al. 2003). Cette approche a permis d'identifier 268 gènes dont le niveau d'expression était augmenté de 1.7 fois par rapport aux cellules où *Sim1* n'était pas surexprimé. Parmi ces 268 gènes, 38 régulateurs de la transcription y étaient identifiés. Seul un d'entre eux, *Ldb2*, a aussi été retrouvé dans notre analyse. Comment expliquer une si grande différence dans les cibles identifiées par ces deux approches ? Tout d'abord, il faut noter que ce n'est pas la même micropuce d'Affymetrix qui a été utilisé dans les deux analyses. La micropuce utilisée dans cette analyse, MG-U74v2 A, ne représente que 12 000 transcrits par rapport aux 39 000 transcrits présents sur la micropuce MOE 430 2.0 que nous avons employée. Même si la plupart des séquences représentées sur la micropuce MG-U74v2 A sont également présentes sur la micropuce MOE 430 2.0, les sondes correspondants à un même gène ne sont pas identiques et peuvent parfois être totalement différentes. Comme indiqué par la

compagnie Affymetrix qui manufacture ces deux produits, les données générées par ces 2 différentes micropuces peuvent donc produire des résultants qui ne sont pas forcément concordant, d'où une différence dans la liste des gènes obtenus. Par ailleurs, le système employé ici est un système de surexpression réalisé *in vitro* qui est forcément moins proche de la réalité : 1) ce n'est pas tissu spécifique puisque les cellules Neuro2A sont des cellules neuronales isolées d'un médulloblastome et ne sont pas spécifiques à l'hypothalamus d'où la présence de cofacteurs qui ne sont peut être pas retrouvés normalement dans l'hypothalamus, 2) ces cellules permettent peut être l'expression de gènes qui possèdent le site de liaison de *Sim1* (CME) mais qui ne sont normalement pas exprimés dans l'hypothalamus, 3) ces cellules sont isolées de lignées cancéreuses donc anormales 4) ces neurones sont des neurones matures et non en développement et n'ont peut être pas le même potentiel génétique que les progéniteurs hypothalamiques. Quoiqu'il en soit ces deux études peuvent être complémentaires dans la mesure où elles apportent des renseignements différents. Cependant ni l'une ni l'autre ne garantissent que les gènes issus de ces analyses sont forcément des régulateurs du développement hypothalamique.

L'étude des patrons d'expression des gènes que nous avons identifiés par notre approche de caractérisation du transcriptome et d'autre gènes issus de la littérature nous a permis de corrélér leur expression avec les vagues de neurogenèse qui ont lieu au cours du développement de l'hypothalamus antérieur. Cette analyse nous a conduit à classer ces gènes dans 3 catégories selon leur patron d'expression médio-latéral dans la zone du manteau au cours du 11ème au 13ème jour de gestation chez la souris. Certains gènes tels que *Brn2*, *Nkx2.2* et *Brn4* voient leur patron d'expression limité à la région la plus médiale de la zone du manteau (catégorie 1), alors que d'autres tels que *Rgs4*, *Ldb2*, *Cart* sont exprimés uniquement dans la partie latérale de la zone du manteau (catégorie 2). Finalement, la troisième classe de gènes comprend ceux qui sont exprimés à la fois dans les régions médiale et latérale. C'est le cas de *Sim1* et *Otp*. Par ailleurs, l'étude de l'expression de ces mêmes gènes à des stades plus tardifs (E15.5) nous a permis de démontrer que les gènes de la catégorie 1 définissent un domaine qui donnera naissance au PVN, alors que les gènes de la catégorie 2 caractérisent des groupes de cellules qui

peupleront plutôt l'hypothalamus ventrolatéral (Fig. 1). Il faut souligner que ce modèle de développement à deux couches semble être conservé chez l'embryon de poulet où il est aussi possible de classer les gènes selon leur patron d'expression médiolatéral et le devenir des régions qu'ils définissent (Caqueret, A. et al. 2005a). L'ensemble de ces données nous offre donc une cartographie de l'hypothalamus en développement qui représente un outil pertinent pour faciliter la dissection du programme développemental de l'hypothalamus.

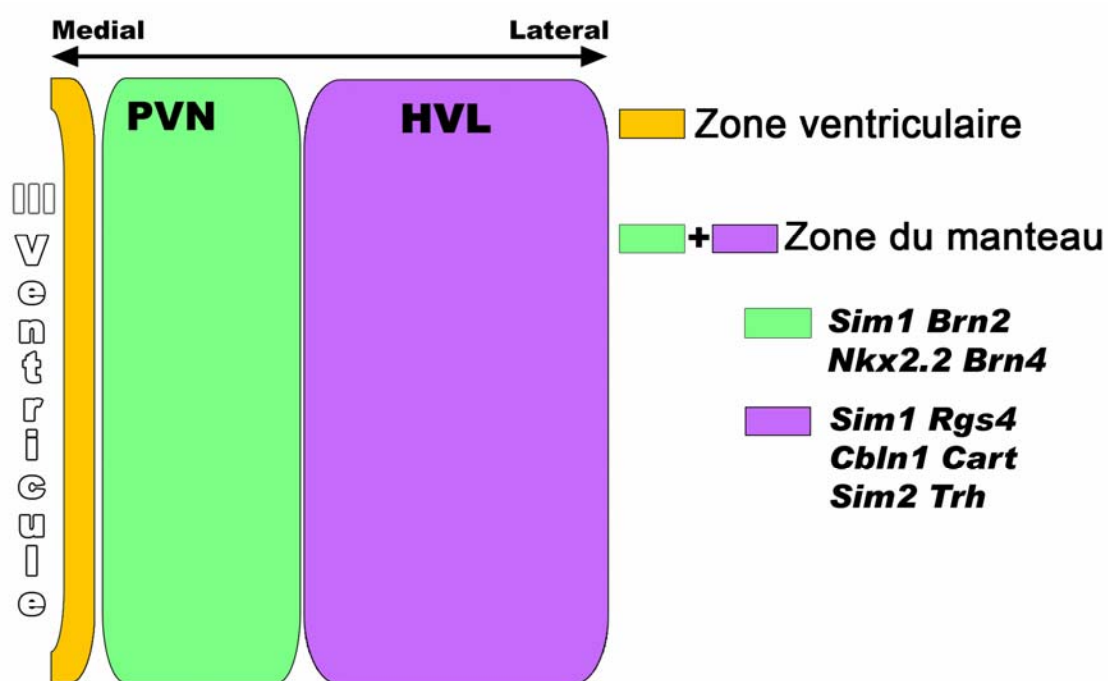


Figure 1. Modèle de développement à deux couches de l'hypothalamus antérieur. Trois catégories de gènes sont exprimées au sein de la zone du manteau. Les gènes de la catégorie 1 (en vert) ont une expression médiale et définissent une région qui donnera naissance au PVN. Les gènes de la catégorie 2 (en mauve) ont un patron d'expression latérale qui caractérise des cellules qui peupleront plus tard au cours du développement les structures ventrolatérales de l'hypothalamus (HVL). Finalement, la catégorie 3 regroupe des gènes qui sont exprimés dans les deux domaines, c'est le cas notamment de *Sim1*.

Nous avons également exploité les résultats générés par les expériences de caractérisation du transcriptome pour faire ressortir une liste de gènes qui sont fortement exprimés au sein de l'hypothalamus antérieur à E12.5 chez des embryons de souris de type sauvage. Nous avons ainsi fait ressortir tous les gènes qui avaient un niveau d'expression égal ou supérieur à celui de *Sim1* et qui ne sont pas régulés par ce dernier. Cette approche nous a permis d'identifier 211 facteurs de transcription avec un haut niveau d'expression. Parmi ces 211 facteurs nous avons étudié l'expression de 12 d'entre eux. Six – *Bhlhb5*, *Bhlhb9*, *Foxg1*, *Neurod1*, *Foxp1* et *Lhx5* - se sont révélés être exprimés dans des régions chevauchant le patron d'expression de *Sim1* (voir chapitre VI, Fig. 2 et 3). La plupart de ces gènes a déjà été associée avec le développement du système nerveux ou démontrée comme étant exprimée au cours du développement de ce dernier (Brunelli, S. et al. 2003; Goebbels, S. et al. 2005; Peng, G. and Westerfield, M. 2006; Siegenthaler, J. A. et al. 2008; Tamura, S. et al. 2003). Nous avons eu la chance de pouvoir étudier le phénotype des embryons de souris *Neurod1*^{-/-} et *Lhx5*^{-/-} grâce à des collaborateurs qui nous ont fourni ces souris. Aucun de ces embryons ne présentait un phénotype anormal au niveau de l'hypothalamus antérieur. L'absence de l'expression de ces gènes ne semble donc avoir aucun impact sur le développement de l'hypothalamus antérieur. Toutefois, puisque des membres de la même famille que ces gènes sont également exprimés au sein de l'hypothalamus antérieur, c'est le cas de *Neurod6*, *Lhx1* et *Lhx2* (voir chapitre VI, Tableau I et Fig. 3), il est possible que la perte d'expression de ces gènes soit compensée par l'expression d'un autre membre de sa famille d'où l'absence de phénotype. Quoiqu'il en soit, cette liste de gènes représente des candidats intéressants pour le développement hypothalamique dont il faudrait vérifier l'expression dans l'hypothalamus antérieur avant d'en étudier la fonction.

Établissement du transcriptome du PVN à E14.5

Le PVN prospectif occupe un petit domaine au sein de la région analysée par l'approche de micropuce à E12.5. De ce fait, les transcrits produits seulement dans ce domaine pourraient ne pas avoir été spécifiquement identifiés à cause d'un phénomène de dilution, leur expression étant noyée dans la masse. De manière similaire, des

transcrits qui sont largement exprimés au sein de l'hypothalamus antérieur mais seulement régulés par *Sim1* au niveau du PVN prospectif, c'est le cas de *Brn2*, n'auraient peut être pas été détectés par cette approche. L'idéal aurait été de pouvoir isoler spécifiquement le PVN prospectif à ce stade pour pouvoir en étudier le transcriptome. Toutefois, si tôt au cours de son développement, cette région est extrêmement petite et difficilement identifiable d'un point de vue morphologique pour en permettre un prélèvement reproductible chez plusieurs embryons. Nous avons donc développé un protocole nous permettant de prélever par une approche de microdissection au laser le PVN prospectif à E14.5 en se basant sur le patron d'expression de *Sim1* qui le caractérise (voir chapitre V). A ce stade le PVN est bien défini tout en étant encore en pleine différenciation neuronale. Il est donc probable que les facteurs de transcription essentiels à cette différenciation soient encore exprimés à ce stade du développement. Toutefois, il nous était impossible de pouvoir prélever le PVN chez les embryons *Sim1*^{-/-} à E 14.5, puisqu'à ce stade les cellules devant peupler le PVN de ces embryons migrent anormalement hors du PVN qui devient alors hypocellulaire. Nous avons donc choisi de comparer le transcriptome du PVN à celui de l'hypothalamus médiobasal. Cette approche nous a permis d'identifier 34 facteurs de transcription spécifiques au PVN. Parmi eux *Sim1* et *Brn2* étaient les plus fortement exprimés. De plus, *Fezf2/Fezl* et *Nkx2.2*, deux gènes qui ont été caractérisés dans la littérature comme étant exprimés ou impliqués dans le développement de l'hypothalamus faisaient également partie de cette liste (Blechman, J. et al. 2007; Briscoe, J. et al. 1999). *Rxrγ* est également ressorti au cours de notre analyse à E12.5, ce qui en fait un candidat très intéressant. *Bhlhb5*, *Neurod1* et *Lhx5* étaient quant à eux identifiés dans notre analyse des facteurs de transcription fortement exprimés à E12.5 et sont aussi spécifiquement exprimés au sein du PVN à E14.5 (voir chapitres V et VI). L'ensemble de ces gènes offre une validation de l'efficacité et de la véracité de notre approche expérimentale en plus de nous ouvrir de nouvelles pistes pour identifier des régulateurs potentiels du développement du PVN.

Établissement du transcriptome de l'ARC à E14.5.

L'ARC est un régulateur critique de l'appétit. Son développement repose tout comme pour le PVN sur une cascade de facteurs de transcription essentielle à la différenciation des divers types cellulaires qui le composent. Nous avons choisi de comparer le transcriptome du PVN au transcriptome de l'hypothalamus médiobasal dont fait principalement partie l'ARC. Cette approche avait pour but de faire ressortir facilement les gènes caractéristiques à ces deux noyaux tout en laissant de côté les facteurs de transcription risquant d'être exprimés dans une grande proportion de l'hypothalamus et qui seraient donc communs à ces deux noyaux. C'est ainsi que le niveau d'expression d'*Otp*, qui est nécessaire au développement du PVN et à la différenciation des cellules à *Ss* dans l'ARC, n'est pas ressorti comme étant exprimé plus fortement dans un ou l'autre de ces noyaux. Quant à la *Ss* qui est à la fois exprimée au sein de l'ARC et de l'aPV, qui est contigu au PVN, elle a été identifiée comme étant spécifique à l'ARC par notre analyse de micropuce. Toutefois, les cellules à *Ss* de l'aPV apparaissent dès E13.5 et auraient dû être détectées par notre approche (Markakis, E. A. 2002). Deux raisons peuvent expliquer cette différence d'expression entre le PVN et l'ARC. Premièrement, il est possible que l'aPV n'ait pas été prélevé de manière reproductible. En effet, même si *Sim1* est exprimé au sein de l'aPV, cette région représente un petit domaine contigu au PVN. Toutefois, puisque située à la périphérie du domaine d'expression de *Sim1*, notre point de repère pour la microdissection, la variation due au prélèvement était sûrement plus grande que pour un domaine situé dans la partie centrale du patron d'expression de *Sim1* d'où une plus grande marge d'erreur. Deuxièmement, il est aussi probable qu'à E14.5 il y ait plus de cellules à *Ss* présentes dans l'ARC que dans l'aPV. Par ailleurs, cet exercice nous a permis d'identifier 76 facteurs de transcription spécifiques à l'ARC. Nous avons pour le moment validé l'expression au sein de l'ARC à E14.5 de certains d'entre eux dont *Six6* et *Tcf7l2* (voir chapitre V, Fig. 2). Nous devons par la suite étudier l'expression et la fonction des autres facteurs de transcription spécifiques à l'hypothalamus médiobasal pour faire ressortir leur possible implication dans le développement de l'ARC.

Intégration des bases de données pour tirer profit de ces résultats.

L'utilisation des approches de caractérisation du transcriptome du PVN à E12.5 et E14.5 ainsi que la revue de la littérature nous a permis de générer de nombreuses données concernant les facteurs de transcription potentiellement exprimés au sein du PVN prospectif. L'expression de certains des gènes identifiés par ces approches a été étudiée chez des embryons de type sauvage et mutant pour *Sim1* (voir récapitulatif chapitre VI, Tableau 1). Toutes ces données offrent une masse considérable d'informations qui peut être difficile à traiter et pouvant contenir de nombreux faux positifs. C'est pourquoi le meilleur moyen d'en tirer le plus de renseignements valables et probablement d'intégrer l'ensemble de ces résultats pour les cribler avec une liste de critères tels que par exemple sélectionner les membres d'une même famille, d'une même voie de signalisation ou des gènes interagissant avec des régulateurs connus du développement hypothalamique. Ceci nous permettra de distinguer les gènes qui ont le plus grand potentiel d'être impliqués au cours du développement du PVN. De plus, le criblage rapide de ces gènes pourrait être réalisé par une approche de perte de fonction chez le poisson-zèbre dont le système neuroendocrinien est bien caractérisé. Cet exercice nous permettrait de faire ressortir rapidement les gènes candidats dont le patron d'expression devra être étudié au cours du développement hypothalamique afin de voir si leur analyse fonctionnelle a intérêt à être réalisée chez la souris soit par gain de fonction via l'approche transgénique ou par perte de fonction en faisant appel aux ressources de la base de données IGTC « *International Gene Trap Consortium* ».

Conclusion

L'ensemble de ces données, les résultats générés par l'analyse des transcriptomes et les données de la littérature, permet une meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent la différenciation cellulaire au sein de l'hypothalamus antérieur. Toutefois, beaucoup d'éléments restent encore inconnus à savoir, entre autre, le nombre et la relation entre les différents effecteurs contrôlant la différenciation cellulaire au sein du PVN/SON. L'ensemble de ces données constitue donc des pistes intéressantes pour

pouvoir parfaire notre connaissance du développement hypothalamique. De plus, plusieurs outils – transgénèse et perte de fonction chez la souris, perte et gain de fonction chez le poisson-zèbre et le poulet- sont aujourd’hui disponibles pour nous permettre de tester la fonction de ces différents gènes candidats au cours du développement hypothalamique. Finalement, nous croyons que la dissection du programme développemental du PVN a le potentiel de nous mener à l’identification de gènes pouvant être associés au développement embryonnaire de cette structure ainsi qu’au maintien de l’homéostasie chez l’individu adulte.

Références:

- Acampora, D., Postiglione, M. P., Avantaggiato, V., Di, Bonito M., Vaccarino, F. M., Michaud, J., and Simeone, A. (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev.* 13: 2787-2800.
- Ahituv, N., Kavaslar, N., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Martin, J., Hebert, S., Doelle, H., Ersoy, B., Kryukov, G., Schmidt, S., Yosef, N., Ruppin, E., Sharan, R., Vaisse, C., Sunyaev, S., Dent, R., Cohen, J., McPherson, R., and Pennacchio, L. A. (2007) Medical sequencing at the extremes of human body mass. *Am. J. Hum. Genet.* 80: 779-791.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1978) Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J. Comp. Neurol.* 182: 973-993.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1986) The development of the rat hypothalamus. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 100: 1-178.
- Alvarez-Bolado, G., Rosenfeld, M. G., and Swanson, L. W. (1995) Model of forebrain regionalization based on spatiotemporal patterns of POU-III homeobox gene expression, birthdates, and morphological features. *J. Comp. Neurol.* 355: 237-295.
- Amore, G., Yavrouian, R. G., Peterson, K. J., Ransick, A., McClay, D. R., and Davidson, E. H. (2003) Spdeadringer, a sea urchin embryo gene required separately in skeletogenic and oral ectoderm gene regulatory networks. *Dev. Biol.* 261: 55-81.
- Anderson, M. G., Perkins, G. L., Chittick, P., Shrigley, R. J., and Johnson, W. A. (1995) drifter, a Drosophila POU-domain transcription factor, is required for correct differentiation and migration of tracheal cells and midline glia. *Genes Dev.* 9: 123-137.
- Arnold-Aldea, S. A. and Cepko, C. L. (1996) Dispersion patterns of clonally related cells during development of the hypothalamus. *Dev. Biol.* 173: 148-161.
- Avantaggiato, V., Pandolfi, P. P., Ruthardt, M., Hawe, N., Acampora, D., Pelicci, P. G., and Simeone, A. (1995) Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J. Neurosci.* 15: 4927-4942.
- Barth, K. A., Kishimoto, Y., Rohr, K. B., Seydler, C., Schulte-Merker, S., and Wilson, S. W. (1999) Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development* 126: 4977-4987.

- Barth, K. A. and Wilson, S. W. (1995) Expression of zebrafish *nk2.2* is influenced by sonic hedgehog/vertebrate hedgehog-1 and demarcates a zone of neuronal differentiation in the embryonic forebrain. *Development* 121: 1755-1768.
- Blechman, J., Borodovsky, N., Eisenberg, M., Nabel-Rosen, H., Grimm, J., and Levkowitz, G. (2007) Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein *Orthopedia*. *Development* 134: 4417-4426.
- Bonaglia, M. C., Ciccone, R., Gimelli, G., Gimelli, S., Marelli, S., Verheij, J., Giorda, R., Grasso, R., Borgatti, R., Pagone, F., Rodriguez, L., Martinez-Frias, M. L., van, Ravenswaaij C., and Zuffardi, O. (2008) Detailed phenotype-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: narrowing the critical region for Prader-Willi-like phenotype. *Eur. J. Hum. Genet.* 16: 1443-1449.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L., and Ericson, J. (1999) Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398: 622-627.
- Brunelli, S., Innocenzi, A., and Cossu, G. (2003) *Bhlhb5* is expressed in the CNS and sensory organs during mouse embryonic development. *Gene Expr. Patterns.* 3: 755-759.
- Burbach, K. M., Poland, A., and Bradfield, C. A. (1992) Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89: 8185-8189.
- Caqueret, A., Boucher, F., and Michaud, J. L. (2006) Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. *Dev. Biol.* 298: 95-106.
- Caqueret, A., Coumailleau, P., and Michaud, J. L. (2005a) Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo. *Dev. Dyn.* 233: 652-658.
- Caqueret, A., Yang, C., Duplan, S., Boucher, F., and Michaud, J. L. (2005b) Looking for trouble: a search for developmental defects of the hypothalamus. *Horm. Res.* 64: 222-230.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H., and Beachy, P. A. (1996) Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383: 407-413.
- Choi, Y. H., Hartzell, D., Azain, M. J., and Baile, C. A. (2002) TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiol. Behav.* 77: 1-4.
- Crews, S. T. (1998) Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev.* 12: 607-620.

- Crews, S. T., Thomas, J. B., and Goodman, C. S. (1988) The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. *Cell* 52: 143-151.
- Dale, J. K., Vesque, C., Lints, T. J., Sampath, T. K., Furley, A., Dodd, J., and Placzek, M. (1997) Cooperation of BMP7 and SHH in the induction of forebrain ventral midline cells by prechordal mesoderm. *Cell* 90: 257-269.
- Dale, K., Sattar, N., Heemskerk, J., Clarke, J. D., Placzek, M., and Dodd, J. (1999) Differential patterning of ventral midline cells by axial mesoderm is regulated by BMP7 and chordin. *Development* 126: 397-408.
- Del, Giacco L., Pistocchi, A., Cotelli, F., Fortunato, A. E., and Sordino, P. (2008) A peek inside the neurosecretory brain through Orthopedia lenses. *Dev. Dyn.* 237: 2295-2303.
- Del, Giacco L., Sordino, P., Pistocchi, A., Andreakis, N., Tarallo, R., Di, Benedetto B., and Cotelli, F. (2006) Differential regulation of the zebrafish orthopedia 1 gene during fate determination of diencephalic neurons. *BMC. Dev. Biol.* 6: 50.
- Di, Bernardo M., Castagnetti, S., Bellomonte, D., Oliveri, P., Melfi, R., Palla, F., and Spinelli, G. (1999) Spatially restricted expression of *PIOtp*, a *Paracentrotus lividus* orthopedia-related homeobox gene, is correlated with oral ectodermal patterning and skeletal morphogenesis in late-cleavage sea urchin embryos. *Development* 126: 2171-2179.
- Dickson, S. L. and Luckman, S. M. (1997) Induction of *c-fos* messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* 138: 771-777.
- Dolwick, K. M., Schmidt, J. V., Carver, L. A., Swanson, H. I., and Bradfield, C. A. (1993a) Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol. Pharmacol.* 44: 911-917.
- Dolwick, K. M., Swanson, H. I., and Bradfield, C. A. (1993b) In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90: 8566-8570.
- Eaton, J. L. and Glasgow, E. (2006) The zebrafish bHLH PAS transcriptional regulator, single-minded 1 (*sim1*), is required for isotocin cell development. *Dev. Dyn.* 235: 2071-2082.
- Eaton, J. L. and Glasgow, E. (2007) Zebrafish orthopedia (*otp*) is required for isotocin cell development. *Dev. Genes Evol.* 217: 149-158.

- Eaton, J. L., Holmqvist, B., and Glasgow, E. (2008) Ontogeny of vasotocin-expressing cells in zebrafish: selective requirement for the transcriptional regulators orthopedia and single-minded 1 in the preoptic area. *Dev. Dyn.* 237: 995-1005.
- Ema, M., Morita, M., Ikawa, S., Tanaka, M., Matsuda, Y., Gotoh, O., Saijoh, Y., Fujii, H., Hamada, H., Kikuchi, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (1996) Two new members of the murine Sim gene family are transcriptional repressors and show different expression patterns during mouse embryogenesis. *Mol. Cell Biol.* 16: 5865-5875.
- Epstein, D. J., Martinu, L., Michaud, J. L., Losos, K. M., Fan, C., and Joyner, A. L. (2000) Members of the bHLH-PAS family regulate Shh transcription in forebrain regions of the mouse CNS. *Development* 127: 4701-4709.
- Estes, P., Mosher, J., and Crews, S. T. (2001) Drosophila single-minded represses gene transcription by activating the expression of repressive factors. *Dev. Biol.* 232: 157-175.
- Faivre, L., Cormier-Daire, V., Lapierre, J. M., Colleaux, L., Jacquemont, S., Genevieve, D., Saunier, P., Munnich, A., Turleau, C., Romana, S., Prieur, M., De Blois, M. C., and Vekemans, M. (2002) Deletion of the SIM1 gene (6q16.2) in a patient with a Prader-Willi-like phenotype. *J. Med. Genet.* 39: 594-596.
- Fan, C. M., Kuwana, E., Bulfone, A., Fletcher, C. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Crews, S., Martinez, S., Puelles, L., Rubenstein, J. L., and Tessier-Lavigne, M. (1996) Expression patterns of two murine homologs of Drosophila single-minded suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Mol. Cell Neurosci.* 7: 1-16.
- Galceran, J., Miyashita-Lin, E. M., Devaney, E., Rubenstein, J. L., and Grosschedl, R. (2000) Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* 127: 469-482.
- Goebbels, S., Bode, U., Pieper, A., Funfschilling, U., Schwab, M. H., and Nave, K. A. (2005) Cre/loxP-mediated inactivation of the bHLH transcription factor gene NeuroD/BETA2. *Genesis.* 42: 247-252.
- Goshu, E., Jin, H., Lovejoy, J., Marion, J. F., Michaud, J. L., and Fan, C. M. (2004) Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol. Endocrinol.* 18: 1251-1262.
- Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B., and Bradfield, C. A. (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 519-561.
- Heisenberg, C. P., Houart, C., Take-Uchi, M., Rauch, G. J., Young, N., Coutinho, P., Masai, I., Caneparo, L., Concha, M. L., Geisler, R., Dale, T. C., Wilson, S. W., and Stemple, D. L. (2001) A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish

Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes Dev.* 15: 1427-1434.

- Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fujii, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K., and Fujii-Kuriyama, Y. (1996) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol. Cell Biol.* 16: 1706-1713.
- Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A., and Hankinson, O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252: 954-958.
- Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Moran, S. M., Shimomura, K., Radcliffe, L. A., Takahashi, J. S., and Bradfield, C. A. (2000) The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J. Neurosci.* 20: RC83.
- Holder, J. L., Jr., Butte, N. F., and Zinn, A. R. (2000) Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 9: 101-108.
- Holder, J. L., Jr., Zhang, L., Kublaoui, B. M., DiLeone, R. J., Oz, O. K., Bair, C. H., Lee, Y. H., and Zinn, A. R. (2004) Sim1 gene dosage modulates the homeostatic feeding response to increased dietary fat in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: E105-E113.
- Huang, Z. J., Edery, I., and Rosbash, M. (1993) PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* 364: 259-262.
- Hung, C. C., Luan, J., Sims, M., Keogh, J. M., Hall, C., Wareham, N. J., O'Rahilly, S., and Farooqi, I. S. (2007) Studies of the SIM1 gene in relation to human obesity and obesity-related traits. *Int. J. Obes. (Lond)* 31: 429-434.
- Ifft, J. D. (1972) An autoradiographic study of the time of final division of neurons in rat hypothalamic nuclei. *J. Comp. Neurol.* 144: 193-204.
- Ikeda, M., Yu, W., Hirai, M., Ebisawa, T., Honma, S., Yoshimura, K., Honma, K. I., and Nomura, M. (2000) cDNA cloning of a novel bHLH-PAS transcription factor superfamily gene, BMAL2: its mRNA expression, subcellular distribution, and chromosomal localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 493-502.
- Kapsimali, M., Caneparo, L., Houart, C., and Wilson, S. W. (2004) Inhibition of Wnt/Axin/beta-catenin pathway activity promotes ventral CNS midline tissue to adopt hypothalamic rather than floorplate identity. *Development* 131: 5923-5933.

- Kiecker, C. and Lumsden, A. (2004) Hedgehog signaling from the ZLI regulates diencephalic regional identity. *Nat. Neurosci.* 7: 1242-1249.
- Kim, C. H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K. B., Chandrasekharappa, S. C., Driever, W., and Chitnis, A. B. (2000) Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* 407: 913-916.
- Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C. H., Ward, J. M., and Gonzalez, F. J. (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 Dev.* 10: 60-69.
- Kublaoui, B. M., Gemelli, T., Tolson, K. P., Wang, Y., and Zinn, A. R. (2008) Oxytocin deficiency mediates hyperphagic obesity of Sim1 haploinsufficient mice. *Mol. Endocrinol.* 22: 1723-1734.
- Kublaoui, B. M., Holder, J. L., Jr., Tolson, K. P., Gemelli, T., and Zinn, A. R. (2006) SIM1 overexpression partially rescues agouti yellow and diet-induced obesity by normalizing food intake. *Endocrinology* 147: 4542-4549.
- Lagutin, O. V., Zhu, C. C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puellas, L., Russell, H. R., McKinnon, P. J., Solnica-Krezel, L., and Oliver, G. (2003) Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev.* 17: 368-379.
- Lako, M., Lindsay, S., Bullen, P., Wilson, D. I., Robson, S. C., and Strachan, T. (1998) A novel mammalian wnt gene, WNT8B, shows brain-restricted expression in early development, with sharply delimited expression boundaries in the developing forebrain. *Hum. Mol. Genet.* 7: 813-822.
- Lee, J. E., Wu, S. F., Goering, L. M., and Dorsky, R. I. (2006) Canonical Wnt signaling through Lef1 is required for hypothalamic neurogenesis. *Development* 133: 4451-4461.
- Li, P., He, X., Gerrero, M. R., Mok, M., Aggarwal, A., and Rosenfeld, M. G. (1993) Spacing and orientation of bipartite DNA-binding motifs as potential functional determinants for POU domain factors. *Genes Dev.* 7: 2483-2496.
- Liu, C., Goshu, E., Wells, A., and Fan, C. M. (2003) Identification of the downstream targets of SIM1 and ARNT2, a pair of transcription factors essential for neuroendocrine cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 278: 44857-44867.
- Manning, L., Ohyama, K., Saeger, B., Hatano, O., Wilson, S. A., Logan, M., and Placzek, M. (2006) Regional morphogenesis in the hypothalamus: a BMP-Tbx2 pathway coordinates fate and proliferation through Shh downregulation. *Dev. Cell* 11: 873-885.

- Marion, J. F., Yang, C., Caqueret, A., Boucher, F., and Michaud, J. L. (2005) Sim1 and Sim2 are required for the correct targeting of mammillary body axons. *Development* 132: 5527-5537.
- Markakis, E. A. (2002) Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol.* 23: 257-291.
- Mathieu, J., Barth, A., Rosa, F. M., Wilson, S. W., and Peyrieras, N. (2002) Distinct and cooperative roles for Nodal and Hedgehog signals during hypothalamic development. *Development* 129: 3055-3065.
- Mendis, D. B., Ivy, G. O., and Brown, I. R. (2000) Induction of SC1 mRNA encoding a brain extracellular matrix glycoprotein related to SPARC following lesioning of the adult rat forebrain. *Neurochem. Res.* 25: 1637-1644.
- Meyre, D., Lecoecur, C., Delplanque, J., Francke, S., Vatin, V., Durand, E., Weill, J., Dina, C., and Froguel, P. (2004) A genome-wide scan for childhood obesity-associated traits in French families shows significant linkage on chromosome 6q22.31-q23.2. *Diabetes* 53: 803-811.
- Michaud, J. L., Boucher, F., Melnyk, A., Gauthier, F., Goshu, E., Levy, E., Mitchell, G. A., Himms-Hagen, J., and Fan, C. M. (2001) Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum. Mol. Genet.* 10: 1465-1473.
- Michaud, J. L., DeRossi, C., May, N. R., Holdener, B. C., and Fan, C. M. (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech. Dev.* 90: 253-261.
- Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R., and Fan, C. M. (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 12: 3264-3275.
- Moffett, P. and Pelletier, J. (2000) Different transcriptional properties of mSim-1 and mSim-2. *FEBS Lett.* 466: 80-86.
- Muller, F., Albert, S., Blader, P., Fischer, N., Hallonet, M., and Strahle, U. (2000) Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development* 127: 3889-3897.
- Murre, C., Bain, G., van Dijk, M. A., Engel, I., Furnari, B. A., Massari, M. E., Matthews, J. R., Quong, M. W., Rivera, R. R., and Stuver, M. H. (1994) Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1218: 129-135.
- Nakai, S., Kawano, H., Yudate, T., Nishi, M., Kuno, J., Nagata, A., Jishage, K., Hamada, H., Fujii, H. and Kawamura, K. (1995) The POU domain transcription

factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev.* 9: 3109-3121.

- Nambu, J. R., Chen, W., Hu, S., and Crews, S. T. (1996) The *Drosophila melanogaster* similar bHLH-PAS gene encodes a protein related to human hypoxia-inducible factor 1 alpha and *Drosophila* single-minded. *Gene* 172: 249-254.
- Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., Jr., and Crews, S. T. (1991) The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67: 1157-1167.
- Nederbragt, A. J., te, Welscher P., van den, Driesche S., van Loon, A. E., and Dictus, W. J. (2002) Novel and conserved roles for orthodenticle/ otx and orthopedia/ otp orthologs in the gastropod mollusc *Patella vulgata*. *Dev. Genes Evol.* 212: 330-337.
- Ohyama, K., Ellis, P., Kimura, S., and Placzek, M. (2005) Directed differentiation of neural cells to hypothalamic dopaminergic neurons. *Development* 132: 5185-5197.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Gruss, P. (1995) Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121: 4045-4055.
- Olson, B. R., Drutarosky, M. D., Chow, M. S., Hraby, V. J., Stricker, E. M., and Verbalis, J. G. (1991) Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 12: 113-118.
- Patten, I., Kulesa, P., Shen, M. M., Fraser, S., and Placzek, M. (2003) Distinct modes of floor plate induction in the chick embryo. *Development* 130: 4809-4821.
- Patten, I. and Placzek, M. (2002) Opponent activities of Shh and BMP signaling during floor plate induction in vivo. *Curr. Biol.* 12: 47-52.
- Peng, G. and Westerfield, M. (2006) Lhx5 promotes forebrain development and activates transcription of secreted Wnt antagonists. *Development* 133: 3191-3200.
- Perdew, G. H. (1988) Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 263: 13802-13805.
- Popperl, H., Schmidt, C., Wilson, V., Hume, C. R., Dodd, J., Krumlauf, R., and Beddington, R. S. (1997) Misexpression of Cwnt8C in the mouse induces an ectopic embryonic axis and causes a truncation of the anterior neuroectoderm. *Development* 124: 2997-3005.

- Puelles, L. (1995) A segmental morphological paradigm for understanding vertebrate forebrains. *Brain Behav. Evol.* 46: 319-337.
- Puelles, L. and Rubenstein, J. L. (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.* 16: 472-479.
- Ramkumar, T. and Adler, S. (1999) A requirement for the POU transcription factor, *Brn-2*, in corticotropin-releasing hormone expression in a neuronal cell line. *Mol. Endocrinol.* 13: 1237-1248.
- Rizzoti, K., Brunelli, S., Carmignac, D., Thomas, P. Q., Robinson, I. C., and Lovell-Badge, R. (2004) *SOX3* is required during the formation of the hypothalamo-pituitary axis. *Nat. Genet.* 36: 247-255.
- Roelink, H., Porter, J. A., Chiang, C., Tanabe, Y., Chang, D. T., Beachy, P. A., and Jessell, T. M. (1995) Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81: 445-455.
- Rohr, K. B., Barth, K. A., Varga, Z. M., and Wilson, S. W. (2001) The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron* 29: 341-351.
- Rubenstein, J. L., Martinez, S., Shimamura, K., and Puelles, L. (1994) The embryonic vertebrate forebrain: the prosomeric model. *Science* 266: 578-580.
- Ryu, S., Mahler, J., Acampora, D., Holzschuh, J., Erhardt, S., Omodei, D., Simeone, A., and Driever, W. (2007) Orthopedia homeodomain protein is essential for diencephalic dopaminergic neuron development. *Curr. Biol.* 17: 873-880.
- Sato, C., Matsuda, T., and Kitajima, K. (2002) Neuronal differentiation-dependent expression of the disialic acid epitope on CD166 and its involvement in neurite formation in Neuro2A cells. *J. Biol. Chem.* 277: 45299-45305.
- Schier, A. F. and Shen, M. M. (2000) Nodal signalling in vertebrate development. *Nature* 403: 385-389.
- Schonemann, M. D., Ryan, A. K., McEvelly, R. J., O'Connell, S. M., Arias, C. A., Kalla, K. A., Li, P., Sawchenko, P. E., and Rosenfeld, M. G. (1995) Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor *Brn-2*. *Genes Dev.* 9: 3122-3135.
- Sekine, H., Mimura, J., Yamamoto, M., and Fujii-Kuriyama, Y. (2006) Unique and overlapping transcriptional roles of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (*Arnt*) and *Arnt2* in xenobiotic and hypoxic responses. *J. Biol. Chem.* 281: 37507-37516.

- Siegenthaler, J. A., Tremper-Wells, B. A., and Miller, M. W. (2008) Foxg1 haploinsufficiency reduces the population of cortical intermediate progenitor cells: effect of increased p21 expression. *Cereb. Cortex* 18: 1865-1875.
- Simeone, A., D'Apice, M. R., Nigro, V., Casanova, J., Graziani, F., Acampora, D., and Avantaggiato, V. (1994) Orthopedia, a novel homeobox-containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and *Drosophila*. *Neuron* 13: 83-101.
- Solomon, N. M., Ross, S. A., Morgan, T., Belsky, J. L., Hol, F. A., Karnes, P. S., Hopwood, N. J., Myers, S. E., Tan, A. S., Warne, G. L., Forrest, S. M., and Thomas, P. Q. (2004) Array comparative genomic hybridisation analysis of boys with X linked hypopituitarism identifies a 3.9 Mb duplicated critical region at Xq27 containing SOX3. *J. Med. Genet.* 41: 669-678.
- Sonnenfeld, M., Ward, M., Nystrom, G., Mosher, J., Stahl, S., and Crews, S. (1997) The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Development* 124: 4571-4582.
- Swanson L.W. (1987) *The Hypothalamus*.
- Swanson, L. W. and Sawchenko, P. E. (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* 6: 269-324.
- Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N., and Fujii-Kuriyama, Y. (1998) Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248: 789-794.
- Tamura, S., Morikawa, Y., Iwanishi, H., Hisaoka, T., and Senba, E. (2003) Expression pattern of the winged-helix/forkhead transcription factor Foxp1 in the developing central nervous system. *Gene Expr. Patterns* 3: 193-197.
- Thomas, J. B., Crews, S. T., and Goodman, C. S. (1988) Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* 52: 133-141.
- Umesono, Y., Watanabe, K., and Agata, K. (1997) A planarian orthopedia homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev. Growth Differ.* 39: 723-727.
- Van Eerdenburg, F. J. and Rakic, P. (1994) Early neurogenesis in the anterior hypothalamus of the rhesus monkey. *Brain Res. Dev.* 79: 290-296.
- Vann, S. D. and Aggleton, J. P. (2004) The mammillary bodies: two memory systems in one? *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 35-44.

- Vann, S. D. and Aggleton, J. P. (2003) Evidence of a spatial encoding deficit in rats with lesions of the mammillary bodies or mammillothalamic tract. *J. Neurosci.* 23: 3506-3514.
- Varela, M. C., Simoes-Sato, A. Y., Kim, C. A., Bertola, D. R., De Castro, C. I., and Koiffmann, C. P. (2006) A new case of interstitial 6q16.2 deletion in a patient with Prader-Willi-like phenotype and investigation of SIM1 gene deletion in 87 patients with syndromic obesity. *Eur. J. Med. Genet.* 49: 298-305.
- Varga, Z. M., Wegner, J., and Westerfield, M. (1999) Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops. *Development* 126: 5533-5546.
- Vettor, R., Fabris, R., Pagano, C., and Federspil, G. (2002) Neuroendocrine regulation of eating behavior. *J. Endocrinol. Invest.* 25: 836-854.
- Wang, J. C., Turner, L., Lomax, B., and Eydoux, P. (2008) A 5-Mb microdeletion at 6q16.1-q16.3 with SIM gene deletion and obesity. *Am. J. Med. Genet. A* 146A : 2975-2978.
- Wang, W. and Lufkin, T. (2000) The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev. Biol.* 227: 432-449.
- Wilson, S. W. and Houart, C. (2004) Early steps in the development of the forebrain. *Dev. Cell* 6: 167-181.
- Wong, L. F. and Murphy, D. (2003) Adenoviral-mediated over-expression of Brn2 in the rat paraventricular nucleus: no effect on vasopressin or corticotrophin releasing factor RNA levels. *Mol. Cell Endocrinol.* 200: 165-175.
- Woo, K. and Fraser, S. E. (1995) Order and coherence in the fate map of the zebrafish nervous system. *Development* 121: 2595-2609.
- Woods, K. S., Cundall, M., Turton, J., Rizotti, K., Mehta, A., Palmer, R., Wong, J., Chong, W. K., Al-Zyoud, M., El-Ali, M., Otonkoski, T., Martinez-Barbera, J. P., Thomas, P. Q., Robinson, I. C., Lovell-Badge, R., Woodward, K. J., and Dattani, M. T. (2005) Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *Am. J. Hum. Genet.* 76: 833-849.
- Woods, S. L. and Whitelaw, M. L. (2002) Differential activities of murine single minded 1 (SIM1) and SIM2 on a hypoxic response element. Cross-talk between basic helix-loop-helix/per-Arnt-Sim homology transcription factors. *J. Biol. Chem.* 277: 10236-10243.
- Xu, C. and Fan, C. M. (2007) Allocation of paraventricular and supraoptic neurons requires Sim1 function: a role for a Sim1 downstream gene PlexinC1. *Mol. Endocrinol.* 21: 1234-1245.

- Yamaguchi, T. P. (2001) Heads or tails: Wnts and anterior-posterior patterning. *Curr. Biol.* 11: R713-R724.
- Yang, C., Gagnon, D., Vachon, P., Tremblay, A., Levy, E., Massie, B., and Michaud, J. L. (2006) Adenoviral-mediated modulation of Sim1 expression in the paraventricular nucleus affects food intake. *J. Neurosci.* 26: 7116-7120.
- Zelzer, E. and Shilo, B. Z. (2000) Interaction between the bHLH-PAS protein Trachealess and the POU-domain protein Drifter, specifies tracheal cell fates. *Mech. Dev.* 91: 163-173.
- Zelzer, E., Wappner, P., and Shilo, B. Z. (1997) The PAS domain confers target gene specificity of *Drosophila* bHLH/PAS proteins. *Genes Dev.* 11: 2079-2089.

CHAPITRE VIII: Annexe I: *Sim1* and *Sim2* are required for the correct targeting of mammillary body axons.

Publié dans:

Development, 132 : 5527-5537, 2005

***Sim1* and *Sim2* are required for the correct targeting of mammillary
body axons.**

Jean-François Marion, Chun Yang, Aurore Caqueret, Francine Boucher and Jacques L.
Michaud*

Research Center, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Quebec, Canada

*Correspondence: Jacques L. Michaud,

Research Center,

Hôpital Sainte-Justine,

3175 Côte Sainte-Catherine,

Montreal, Quebec,

Canada H3T 1C5

Key words: Hypothalamus, Transcription factor, Mammillary body,
Mouse, *Sim1*, *Sim2*

Contribution:

J'ai réalisé l'ensemble des expériences nécessaires à l'élaboration de la figure 10 de cet article.

Summary

The mammillary body (MB), and its axonal projections to the thalamus (mammillothalamic tract, MTT) and the tegmentum (mammillotegmental tract, MTEG), are components of a circuit involved in spatial learning. The bHLH-PAS transcription factors SIM1 and SIM2 are coexpressed in the developing MB. We have found that MB neurons are generated and that they survive at least until E18.5 in embryos lacking both *Sim1* and *Sim2* (*Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-}). However, the MTT and MTEG are histologically absent in *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-} embryos, and are reduced in embryos lacking *Sim1* but bearing one or two copies of *Sim2*, indicating a contribution of the latter to the development of MB axons. We have generated, by homologous recombination, a null allele of *Sim1* (*Sim1*^{tlz}) in which the *tau-lacZ* fusion gene was introduced, allowing the staining of MB axons. Consistent with the histological studies, *lacZ* staining showed that the MTT/MTEG is barely detectable in *Sim1*^{tlz/tlz}; *Sim2*^{+/-} and *Sim1*^{tlz/tlz}; *Sim2*^{-/-} brains. Instead, MB axons are splayed and grow towards the midline. *Slit1* and *Slit2*, which code for secreted molecules that induce the repulsion of ROBO1-producing axons, are expressed in the midline at the level of the MB, whereas *Robo1* is expressed in the developing MB. The expression of *Rig-1/Robo3*, a negative regulator of *Slit* signalling, is upregulated in the prospective MB of *Sim1/Sim2* double mutants, raising the possibility that the growth of mutant MB axons towards the midline is caused by a decreased sensitivity to SLIT. Finally, we found that *Sim1* and *Sim2* act along compensatory, but not hierarchical, pathways, suggesting that they play similar roles in vivo.

Introduction

The mammillary bodies (MBs), which lie at the caudal end of the hypothalamus, are composed of the lateral and medial mammillary nuclei. The MBs participate in two pathways that are essential for processing spatial information (reviewed by Vann, S.D. and Aggleton, J. P. 2004). First, the MBs link two brain regions that are crucial for episodic spatial memory, the hippocampus and the anterior thalamus, by receiving afferents from the former via the fornix, and by sending efferents to the latter via the mamillothalamic tract (MTT) (Van der Kooy, D. et al. 1978; Cruce, J. A. 1977; Hayakawa, T. and Zyo, K. 1989; Allen, G. V. and Hopkins, D. A. 1990). Second, the lateral mammillary nucleus contains head direction cells that aid navigation by firing selectively when an animal is facing in a specific direction in the horizontal plane (Vann, S. D. and Aggleton, J. P. 2003). Reciprocal loops connect the MB and some tegmental centers with the efferent MB axons forming the mamillothalamic tract (MTEG) (Sharp, P. E. et al. 2001). The lateral mammillary nucleus is likely to be important for transforming the vestibular information provided by the tegmentum to help signal head direction. It has been suggested that the head direction cells are responsible for the spatial memory function of the MB. However, lesions involving both the lateral and medial nuclei result in a more severe learning defect than those restricted to the lateral nuclei, suggesting that the medial nuclei also contribute to the spatial memory process.

Most MB neurons send axonal projections to both the anterior thalamic nuclei and the tegmentum via the MTT and the MTEG, respectively. The MTEG is one of the earliest tracts to develop in the CNS, appearing at about E10.5 (Easter, S. S. et al. 1993; Mastick, G. S. and Easter, S. S. Jr 1996). Much later, at about E17.5, each axon of the MTEG generates collateral that will contribute to the formation of the MTT (Van der Kooy, D. et al. 1978; Cruce, J. A. 1977; Hayakawa, T. and Zyo, K. 1989; Allen, G. V. and Hopkins, D. A. 1990). A minority of MB neurons appear to contribute only to the MTT (Hayakawa, T. and Zyo, K. 1989). MTT axons are induced near the boundary between the dorsal and ventral thalami. Recent observations indicate that the transcription factors PAX6 and FOXB1 regulate the expression of signals in this region that induce and/or guide MTT axons (Valverde, F. et al. 2000; Alvarez-Bolado, G. et al.

2000). Both *Pax6* and *Foxb1* mutant mice are born with an intact MTEG but without a MTT. In *Foxb1* mutant embryos, MTT axons are induced but do not grow into the thalamus, whereas branching does not occur at all in *Pax6* mutants. PAX6 is produced in a domain surrounding the MTEG, at the level of the bifurcation, as well as along the dorsal border of the ventral thalamus. *Foxb1* is expressed along the ventral border of the dorsal thalamus and in the MB. Chimera analysis, however, indicates that *Foxb1* functions in the thalamus to promote MTT formation. The requirements for MTT axon guidance are thus complex, as the signals controlled by *Pax6* and *Foxb1* are produced by closely located but non-overlapping regions of the thalamus.

The bHLH-PAS transcription factors SIM1 and SIM2 are closely related paralogues, the expression profiles of which overlap in regions of the anterior hypothalamus that will give rise to the paraventricular (PVN), supraoptic (SON) and anterior periventricular (APV) nuclei (Fan, C-M. et al. 1996). *Sim1* is required for the differentiation of virtually all neurons of the PVN/SON/APV, whereas *Sim2* controls the differentiation of a subset of PVN and APV neurons (Michaud, J. L. et al. 1998; Goshu, E. et al. 2004). The interplay between *Sim1* and *Sim2* is complex; mutant analysis indicates that *Sim1* acts upstream of *Sim2*, but can also compensate for the lack of *Sim2*, albeit ineffectively. SIM1 and SIM2 belong to a group of proteins that need to heterodimerize with members of another group of bHLH-PAS proteins for which there are only four representatives yet characterized: ARNT (Hoffman, E. C. et al. 1991), ARNT2 (Hirose, K. et al. 1996), BMAL1/MOP3 (ARNTL – Mouse Genome Informatics) (Hogenesch, J. B. et al. 1997; Ikeda, M. and Nomura, M. 1997; Takahata, S. et al. 1998; Wolting, C. D. and McGlade, C. J. 1998) and BMAL2/MOP9 (ARNTL2 – Mouse Genome Informatics) (Hogenesch, J. B. et al. 2000; Maemura, K. et al. 2000; Okano, T. et al. 2001; Ikeda, M. et al. 2000). Biochemical, expression and mutant analyses indicate that ARNT2 acts as the dimerizing partner of SIM1, and presumably SIM2, for anterior hypothalamus development (Michaud, J. L. et al. 2000; Hosoya, T. et al. 2001; Keith, B. et al. 2001).

Sim1 and *Sim2* are also expressed in the prospective MB. Their function during the development of this structure has not yet been elucidated. Here, we show that MB neurons are generated, but that the MTEG and MTT do not develop, in embryos lacking both *Sim1* and *Sim2*. Instead, MB axons aberrantly cross the midline. The same abnormalities, although less severe, are observed in embryos with reduced dosages of *Sim1* or *Sim2*. Expression and mutant studies indicate that *Sim1* and *Sim2* act along compensatory pathways that do not require *Arnt2* function. We propose that *Sim1* and *Sim2* regulate the expression of molecules involved in the polarized growth of MB axons.

Materials and methods

Generation of the Sim1^{tlz} allele

Two and 4.5 kb fragments, corresponding, respectively, to the left and right arms of the targeting vector, were amplified by PCR from a *Sim1* BAC clone originating from a 129/Sv mouse genome, and cloned into a Bluescript plasmid. A *Pgk-neo* cassette was inserted downstream of a *Tau-lacZ* fusion gene (generous gift of J. B. Thomas, Salk Institute, San Diego) and *loxP* sites were introduced on both sides of *Pgk-neo*. The whole *Pgk-neo/Tau-lacZ* cassette was cloned between the two arms of homologous sequences. Finally, a *Pgk-tk* cassette was inserted at the 5' end of the construct.

Twenty micrograms of the construct was linearized at an *AscI* site located at its 3' end and electroporated into passage 13 R1 ES cells, which were grown as previously described (Michaud, J. L. et al. 1998). To obtain negative and positive selection for homologous recombinants, gancyclovir and G418 were added to the culture medium at a final concentration of 0.55 $\mu\text{g/ml}$ and 150 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Double resistant clones were further analyzed by Southern blotting, using a probe containing *Sim1* genomic sequences 5' of those used in the targeting vector. This probe hybridizes to a 5.2-kb *BamHI* fragment of the wild-type *Sim1* allele and to a 4.5-kb *BamHI* fragment of the *Sim1* mutant allele. Homologous recombinant ES cell clones were microinjected into

C57BL/6 blastocysts to produce chimeric mice. The resulting male chimeras were backcrossed to C57BL/6 females.

Genotyping of mice

The production and genotyping of mice and embryos carrying the *Sim1*⁻ or *Sim2*⁻ alleles have been previously described (Michaud, J. L. et al. 1998; Goshu, E. et al. 2003). *Sim1*^{flz} embryos and mice were genotyped by PCR, using two sets of primers. The first set was designed to detect the mutant allele, and amplifies a 189-bp fragment of the *neo* gene. The second set was designed to detect the wild-type *Sim1* allele, and amplifies a 250-bp fragment that is deleted in the mutant allele. The sequences of these primers are as follows: *neo*, CTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATG and GTCAAGACCGACCTGTCCGGTGC; *Sim1*, CCGAGTGTGATCTCTAATTGA and TAGGCACAGACGCTTACCTT. The reaction was carried out at 94°C for 30 seconds, 54°C for 45 seconds, and 72°C for 45 seconds, with 10% DMSO for 32 cycles, using *Taq* polymerase.

Genotyping of double mutants was performed by Southern blot using 5' external probes. The same probe was used for the detection of the *Sim1*⁻ and *Sim1*^{flz} alleles. This probe hybridizes to a 5.2-kb *Bam*HI fragment of the wild-type *Sim1* allele, to a 3.4-kb *Bam*HI fragment of the *Sim1*⁻ allele and to a 4.5-kb fragment of the *Sim1*^{flz} allele. The *Sim2* probe hybridizes to an 11-kb *Eco*RI fragment of the wild-type *Sim2* allele and to a 12-kb *Eco*RI fragment of the *Sim2*⁻ allele.

C112k mice, which were derived at the Oak Ridge National Laboratory, carry a microdeletion encompassing *Arnt2* (Michaud, J. L. et al. 2000). The anterior hypothalamus defect maps to a 320-350 kb region, of which the *Arnt2* structural genes spans 140-170 kb. Wild-type and heterozygous embryos were distinguished from homozygotes by the lack of eye pigmentation in the latter.

Histology, in situ hybridization, β -galactosidase staining and DiI labelling

All analyses were carried out on at least two different embryos of the same stage and with the same genotype. For histology, embryo and newborn brains were fixed in Carnoy's fluid, embedded in paraffin, sectioned at 6 μ m and stained with Haematoxylin. In situ hybridization was performed on paraffin sections, as previously described (Michaud, J. L. et al. 1998). The following probes were generous gifts: *Foxb1* (P. A. Laboski, University of Pennsylvania, Philadelphia); *Nkx2.1* (J. L. R. Rubenstein, University of California, San Francisco); *Robo1*, *Robo2*, *Slit1*, *Slit2* and *Slit3* (M. Tessier-Lavigne; Stanford University, Stanford); *Rig-1* (A. Chédotal, CNRS/Université de Paris, Paris); *Sim1* and *Sim2* (C.-M. Fan, Carnegie Institute of Washington, Baltimore). The *Lhx1* probe was generated by RT-PCR. Whole brains stained for β -galactosidase activity were sectioned at 100 μ m with a vibratome. DiI crystals (Molecular Probes) were inserted into the MB of E14.5 brains fixed with 4% paraformaldehyde. These brains were incubated in paraformaldehyde for one week at room temperature and then sectioned at 100 μ m with a vibratome.

Results

*Development of mammillary body projections requires *Sim1* and *Sim2**

Extrapolation from birth dating studies performed in rats suggests that MB neurons are born between E10.5 and E13.5 in mice, exiting the cell cycle to migrate from the ventricular layer, which contains their progenitors, into the mantle layer in which they complete their differentiation (Altman, J. and Bayer, S. A. 1978). Previous studies have shown that *Sim1* and *Sim2* start to be expressed in the neuroepithelium that will give rise to the MB at E9.5, before the birth of the first neurons (Fan, C-M. et al. 1996). We performed a detailed comparison of the expression patterns of *Sim1* and *Sim2* in the prospective MB at latter stages because such a description was lacking. At E10.5, *Sim1* is strongly expressed in the mantle layer, which contains the firstborn MB neurons, and at weaker levels in the ventricular layer (Fig. 1A). At that stage, *Sim2* is co-

expressed with *Sim1* in the ventricular layer, whereas its expression in the mantle layer is much weaker (Fig. 1B). At E11.5 and E12.5, *Sim1* is mainly expressed in the whole mantle layer containing the prospective MB and more discretely in the adjacent ventricular zone. By contrast, *Sim2* transcripts are found in abundance in the ventricular zone and in the medial aspect of the mantle layer (Fig. 1C-F). At these stages, *Sim1* and *Sim2* are thus coexpressed in the ventricular layer and in the medial aspect of the mantle layer, which presumably contains neurons of latter generations. At E14.5, *Sim1* shows the same expression pattern, whereas *Sim2* expression becomes weak and restricted to the ventricular layer (Fig. 1G, H). At E18.5, *Sim1* is expressed in the medial and lateral mammillary nuclei, but we could not detect *Sim2* expression in the MB (not shown). Therefore, *Sim1* and *Sim2* are co-expressed in post-mitotic cells of the MB only during a short period, before E14.5, because *Sim2* expression in the mantle zone is transient whereas that of *Sim1* is continuous.

We next performed a histological analysis of E18.5 embryos with different dosages of *Sim1* and *Sim2* in order to determine whether the loss of these genes affects MB development. The MB appears histologically normal in all of these embryos, including those with a loss of both *Sim1* and *Sim2*. Remarkably, the principal mammillary axonal tract (PMT), which gives rise to the MTEG and the MTT, appears less prominent in *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{+/+} embryos than in control or *Sim1*^{+/+};*Sim2*^{-/-} embryos (Fig. 2, Fig. 3A-F). However, *Sim2* is also required for the development of MB axons, as *Sim1*/*Sim2* double mutants show a thin PMT and no detectable MTT, a more severe phenotype than that observed in *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{+/+} mice (Fig. 3I, L). *Sim1*^{+/-};*Sim2*^{-/-} and *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{+/-} embryos have a MB phenotype comparable to that of *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{+/+} embryos (Fig. 3G, H, J, K). All together, these results indicate that both *Sim1* and *Sim2* are required for MB axonal development, with *Sim1* having a predominant role over *Sim2*.

ARNT2, the bHLH-PAS dimerizing partner of SIM1, and presumably of SIM2, for anterior hypothalamus development, is expressed extensively in the CNS, including in the developing MB. We determined whether ARNT2 acts as a dimerizing partner of

SIM1 and SIM2 for MB axonal development by comparing histologically the brains of E18.5 wild-type and *C112k* homozygous embryos, which carry a microdeletion encompassing the *Arnt2* locus (Michaud, J. L. et al. 2000). Surprisingly, we found that the MTT and the MTEG are intact in these *C112k* mutants. All together, these observations raise the possibility that another dimerizing partner interacts with SIM1 and SIM2 for MB axonal development.

A Sim1^{tlacZ} allele allows staining of mammillary body axons

In order to further characterize the axonal projections originating from *Sim1*-expressing cells, we generated a new targeted allele of *Sim1* (*Sim1^{tlz}*) in which the initiation codon and the basic and HLH domains were replaced by a *Tau-lacZ* fusion gene (Fig. 4A). The targeted region overlaps with that of the initial *Sim1* mutant allele (*Sim1⁻*), in which the initiation codon and the basic domain were deleted. This *Sim1^{tlz}* allele, predicted to be a null, would allow us to stain the MB axons that express *Sim1* and follow their fate in the context of a decrease of *Sim1* and/or *Sim2*. Using a double-selection strategy, we obtained 12/140 (9%) ES cell clones in which the *Sim1* locus had undergone homologous recombination. One of these clones was used to generate a male chimera that was crossed to a C57Bl/6 female, resulting in germline transmission of the targeted allele (Fig. 4B). Mice homozygous for this allele show the same phenotypes as those described in mice with the previously described *Sim1⁻* allele: *Sim1^{tlz/tlz}* mice die shortly after birth with a severe defect of the PVN/SON/APV (data not shown). Also, the pattern of *lacZ* staining in the brain of *Sim1^{tlz/+}* embryos and newborn mice was comparable to the distribution of the *Sim1* transcript (compare Fig. 1G and Fig. 5F). Finally, histological analysis showed that the MB of newborn *Sim1^{tlz/tlz};Sim2^{-/-}* mice is preserved, whereas the MTT and PMT are not detectable (Fig. 4C, D). All together, these results indicate that the *Sim1^{tlz}* allele is suitable to study the impact of *Sim1* function during MB development.

Sim1/Sim2 mutant axons are directed towards the midline

We next stained E14.5 brains with variable dosage of the *Sim1^{tlz}* and *Sim2⁻* alleles for β -galactosidase (β -gal) activity. The PMTs of *Sim1^{tlz/+};Sim2^{+/-}* and *Sim1^{tlz/+};Sim2^{-/-}* brains are clearly recognizable, and their sizes are comparable (Fig. 5A, B, F, G, K, L, P, Q). At the level of the anterior MB, the PMT bundle progresses in a domain dorsal to the MB that produces the β -gal activity. Anteriorly, only one bundle of MB axons appears to develop, whereas more posteriorly, several bundles merge to form the main PMT bundle before it leaves the MB domain (compare Fig. 5A, B and 5P, Q). By contrast, the PMT is greatly reduced in *Sim1^{tlz/tlz};Sim2^{+/+}* brains (Fig. 5C, H, M, R). At the most posterior aspect of the MB, a bundle presumably corresponding to the PMT is recognizable, but is accompanied by additional axons, originating more laterally, which project towards the midline and become splayed on their way to reaching it. These findings are more striking in *Sim1^{tlz/tlz};Sim2^{+/-}* and *Sim1^{tlz/tlz};Sim2^{-/-}* brains, in which a PMT is barely recognizable and a group of ectopic axons similar to that observed in *Sim1^{tlz/tlz};Sim2^{+/+}* brains, but more prominent, is found (Fig. 5D, E, I, J, N, O, S, T). At the most posterior level of the MB, these axons cross the midline ventrocaudally to the third ventricle. In embryos lacking two copies of *Sim1*, the number of bundles arising in the MB appears somewhat decreased. Of note, we did not observe consistent changes of *Tau-lacZ* expression according to the different genotypes in the region located dorsally to the MB, in which PMT axons progress.

No difference between the pattern of *lacZ* staining of axonal projections in genetic compound mutants for the *Sim1⁻* and *Sim1^{tlz}* alleles versus that of homozygotes was detected, which was consistent with the assumption that the *Tau-lacZ* fusion gene does not generally affect axon development in mice (data not shown). In order to further validate the use of the *Sim1^{tlz}* allele to label MB axons, we inserted crystals of DiI into the MB of E14.5 *Sim1^{+/-};Sim2^{+/-}* and *Sim1^{-/-};Sim2^{-/-}* embryos, and compared their pattern of axonal projections. The PMT was clearly labeled in control embryos and very rare axons could be seen progressing towards the midline (Fig. 6A, B). By contrast, most MB axons are directed towards the midline in *Sim1^{-/-};Sim2^{-/-}* embryos. The axons

become splayed as they reached the midline but a subset of these form a bundle crossing the midline ventrally (Fig. 6C, D). This pattern is similar to that observed with the *Sim1^{tlz}* allele, indicating that the latter is expressed in most MB axons. This observation supports our conclusion that the expression of the *Sim1^{tlz}* allele per se does not affect MB axon development.

We next used this combination of *Sim1⁻* and *Sim1^{tlz}* alleles to study MB axonal projections in E11.5 embryos, shortly after they appeared. In *Sim1^{tlz/+};Sim2^{+/-}* and *Sim1^{tlz/+};Sim2^{-/-}* embryos, MB axons form bundles converging dorsally within a *Tau-lacZ* expression domain (Fig. 7A, B). These bundles are less prominent, but are nevertheless oriented dorsally in *Sim1^{tlz/-};Sim2^{+/-}* embryos (Fig. 7C). By contrast, MB axon bundles are not detectable in *Sim1^{tlz/-};Sim2^{-/-}* embryos, suggesting either that the axons are splayed, not forming bundles and thus escaping detection by β -galactosidase staining, or that their development is delayed (Fig. 7D). The loss of *Sim1* and *Sim2* therefore affects the early development of MB axons.

Sim1/Sim2 mutant neurons are generated and survive until E18.5

The MB appears histologically intact in *Sim1/Sim2* double mutants. In order to determine whether *Sim1/Sim2* affects the differentiation of the MB, we performed marker analysis. The *Sim1* mutant allele is a null but this does not interfere with the production and stability of its transcript, which can be used to follow the fate of *Sim1* mutant cells (Michaud, J. L. et al. 1998). We found that the expression of the *Sim1* mutant transcript in the MB of E12.5 *Sim1^{-/-};Sim2^{-/-}* embryos is comparable to that of controls, consistent with the fact that the production of the TAU- β -gal fusion protein is maintained in the MB of E14.5 mutant embryos (Fig. 8A, B). Similarly, we found that *Lhx1* and *Nkx2.1* expression is maintained in the MB of E12.5 double mutants (Fig. 8C-F). Of note, the expression of *Sim1*, *Lhx1* and *Nkx2.1* is also maintained in a domain dorsal to the E12.5 MB, in which the PMT progresses. Because *Sim1*, *Lhx1* and *Nkx2.1* are expressed in virtually all MB cells, the loss of *Sim1* and *Sim2* thus does not seem to

affect the generation and survival of postmitotic neurons in the developing MB. By contrast, *Foxb1* expression is dramatically decreased in the prospective MB and in the dorsal domain of *Sim1^{-/-};Sim2^{-/-}* embryos, but not in those of embryos with at least one allele of *Sim1/Sim2*, indicating that *Sim1/Sim2* acts upstream of *Foxb1* (Fig. 8G, H, Fig. 9E-H). At E18.5, *Lhx1* expression remains robust in the MB of double mutants, whereas the expression of the *Sim1* mutant transcript is decreased (Fig. 9C, D).

The conservation of *Sim1* expression in the MB of double mutants indicates that *Sim1* expression does not require the presence of *Sim2*. Conversely, we found that *Sim2* expression is maintained in the MB of E12.5 *Sim1^{-/-}* embryos (data not shown). Therefore, *Sim1* and *Sim2* function along compensatory but not hierarchical pathways during MB development.

Sim1 and Sim2 upregulate Rig-1/Robo3 expression in the developing mammillary body

SLIT2, a secreted molecule that induces the repulsion of axons that express its receptor ROBO1 or ROBO2, is produced in the ventricular layer of the hypothalamus. Dopaminergic axons, which normally progress longitudinally, are attracted by the ventral midline of the hypothalamus in *Slit2* mutant embryos (Bagri, A. et al. 2002). A similar phenotype is observed in *Nkx2.1* mutant embryos; one study showed that dopaminergic axons actually cross the midline in the ventral part of the caudal hypothalamus (Marin, O. et al. 2002; Kawano, H. et al. 2003). *Slit2* expression in the ventral hypothalamus is downregulated in these mutants, suggesting that the decrease of this factor causes the abnormal axonal targeting. Interestingly, *slit* expression in the midline cells of the central nervous system of the fly embryo is directly controlled by *sim*, a homolog of *Sim1* and *Sim2* (Wharton, K. A. and Crews, S. T. 1993). In order to explore the possibility that such an interaction has been conserved in vertebrates, we examined the expression of *Slit1*, *Slit2* and *Slit3* at E11.5, as well as at E12.5, when mutant MB axons start to grow towards the midline. We found that *Slit1* is expressed in a patch of the ventricular layer dorsal to the prospective MB that corresponds to the area

of the midline towards which mutant axons grow, whereas *Slit2* is expressed in the ventricular layer adjacent to and dorsal to the MB (Fig. 10A, C, E, G; data not shown). *Slit1* and *Slit2* expression in the caudal hypothalamus was not modified in E11.5 and E12.5 *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-} embryos (Fig. 10B, D, F, H; data not shown). *Slit3* was not expressed in this region in *Sim1*^{+/+}; *Sim2*^{+/+} or *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-} embryos (data not shown). These observations indicate that *Sim1* and *Sim2* do not regulate the expression of the SLIT genes in the developing MB.

In order to determine whether other components of this molecular system are involved in the genesis of the phenotype, we next compared the expression of *Robo1*, *Robo2* and *Rig-1/Robo3* in the MB of E11.5 and E12.5 wild-type and *Sim1/Sim2* mutant embryos. *Robo1* is expressed almost ubiquitously in the caudal hypothalamus, with higher levels found in the prospective MB (Fig. 10I, K; data not shown). *Robo2* is not expressed in the MB, but it is expressed in more dorsal regions (not shown). The expression of *Robo1* and *Robo2* in the caudal hypothalamus was unchanged in E11.5 and E12.5 *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-} embryos (Fig. 10J, L; data not shown). *Rig-1/Robo3* is a distant homolog of *Robo1* and *Robo2* that appears to function in a cell autonomous fashion to inhibit SLIT signalling by a mechanism that has not yet been resolved (Sabatier, C. et al. 2004; Marillat, V. et al. 2004). At E11.5, *Rig-1/Robo3* is expressed in a small patch that is contained within the anterior aspect of the *Sim1* domain, but its expression is not found more posteriorly (Fig. 10U, W, Y, A'). In *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-}, as well as in *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{+/-}, embryos, this anterior domain of expression is dramatically expanded, whereas *Rig-1 / Robo3* expression becomes detectable in the posterior MB (Fig. 10V, X, Z, B' and data not shown). At E12.5, *Rig-1/Robo3* is expressed in a narrow domain that extends obliquely within the mantle layer of the anterior MB (Fig. 10M). Its medial half overlaps with the dorsal aspect of the MB prospective domain, as indicated by comparison with the *Sim1* expression pattern, whereas its lateral half is located more dorsally. In *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-} and *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{+/-} embryos, *Rig-1/Robo3* is expressed ectopically in the ventrolateral aspect of the anterior MB domain, whereas its expression dorsally from this domain is reduced (Fig. 10N and data not shown). At the level of the posterior MB, *Rig-1/Robo3* expression is barely detectable in control

littermates (Fig. 10O). By contrast, *Rig-1/Robo3* expression is clearly detectable in the posterior MB of *Sim1^{-/-}; Sim2^{-/-}* and *Sim1^{-/-}; Sim2^{+/-}* embryos, being restricted to its lateral aspect (Fig. 10P). In summary, *Rig-1/Robo3* is expressed ectopically in the developing MB of *Sim1/Sim2* double mutants, raising the possibility that it contributes to the axonal defects by decreasing the sensitivity of MB axons to *Slit* signalling.

Discussion

The loss of *Sim1/Sim2* produces a complex axonal phenotype that is characterized by the hypodevelopment of the PMT and the presence of axons either directed towards the midline or crossing it. The severity of these two features increases progressively with the dosage of *Sim1/Sim2* mutant alleles. SIM1 and SIM2 are thus novel examples of a growing group of transcription factors that act as critical regulators of axonal morphogenesis and connectivity, and they represent crucial reference points for further dissection of axonal development in the MB. Interestingly, the optic lobes of *sim* mutant flies show aberrant axonal projections, whereas the neurons in which *sim* is expressed are present, raising the possibility that the function of *Sim1* in axonal development has been conserved through evolution (Pielage, J. et al. 2002).

Requirement of Sim1 and Sim2 for MB axonal development

Axonal growth cones are under the influence of attractive and repulsive signals that guide their growth in the developing brain (reviewed by Giger, R. J. and Kolodkin, A. L. 2001). Recent studies indicate that several groups of longitudinal axons are repulsed from the midline by SLIT during development (Bagri, A. et al. 2002). *Slit1* and *Slit2* are expressed in the ventricular layer adjacent to the MB, as well as dorsally, whereas *Robo1* is expressed in the MB. These observations suggest that SLIT signalling might also repulse MB axonal cones from the midline, a possibility that needs to be validated through gain or loss-of-function experiments in mice. Interestingly, we have found that *Rig-1/Robo3* expression is upregulated in the prospective MB domain of

Sim1^{-/-};*Sim2*^{+/-} and *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-} embryos. *Rig-1/Robo3* functions in a cell autonomous fashion to inhibit SLIT signalling in neurons of the spinal cord and hindbrain (Sabatier, C. et al. 2004; Marillat, V. et al. 2004). We propose that a loss of repression of *Rig-1/Robo3* in *Sim1/Sim2* mutant MB neurons decreases the responsiveness of their axons to SLIT, resulting in their growth towards the midline. Consistent with this possibility, E14.5 *Sim1/Sim2* mutant axons originate from the lateral and posterior MB, where ectopic *Rig-1/Robo3* expression is detected at E12.5. Of note, whereas *Rig-1/Robo3* expression is upregulated in the MB domain of mutant embryos, we found that it is decreased in a domain located immediately dorsal to that of the MB. The decrease of *Rig-1/Robo3* expression in this dorsal domain could reflect either distinct regulatory interactions or impaired development of these cells.

Ectopic expression of *Rig-1/Robo3* in the developing MB, however, does not readily explain other aspects of the axonal phenotype of *Sim1/Sim2* embryos. At E11.5, mutant axons do not form clearly recognizable bundles, suggesting a decrease of MB projections, while there are not yet axons directed towards the midline. At E14.5, bundles projecting towards the midline are present in the posterior MB of mutant embryos, but there are no visible axons originating from the anterior MB of these mutants. These observations suggest a decrease of axonal growth in *Sim1/Sim2* mutants that cannot be simply explained by an abnormal interaction with the midline. One possibility would be that SLIT2, produced by the ventricular layer that lies ventromedially to the MB, repulses the axons dorsally, contributing to their polarized growth.

Other explanations can be proposed to account for the decrease of axonal growth in the double mutants. For instance, *Sim1/Sim2* could function in a cell-autonomous fashion to regulate the expression of signalling components required for response to an attracting signal. Alternatively, *Sim1* and *Sim2* would be required in the environment in which the MB axons progress to control the expression of an attractive or a permissive signal. Indeed, *Sim1* is expressed in a domain dorsal to the MB, which contains the PMT from the time of its appearance. Before E11.5, *Sim1* and *Sim2* expression overlaps in a

region of the ventricular layer that presumably gives rise to MB and the dorsal domain. At later stages, they are co-expressed in the lateral ventricular layer and in the medial aspect of the mantle layer of the prospective MB, but do not overlap in the dorsal domain. If *Sim1* and *Sim2* are indeed required in the dorsal domain for the correct development of MB axons, one might postulate that they function at an early stage in precursors of the cells of the dorsal domain. The fact that *Foxb1* expression in this domain is downregulated in the *Sim1/Sim2* double mutant, but not in *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{+/+} embryos, indicates that *Sim2* can influence expression in these dorsal cells. Finally, *Sim1* could function in both the axons and their surrounding tissues, as was shown for the transcription factor Lola in the developing fly (Crowner, D. et al. 2002).

Cascade of transcription factors controlling MB development

Signals produced by axial mesodermal structures, such as *Shh* and *Bmp7*, are required to induce *Nkx2.1* expression in the neuroepithelium that will give rise to ventral regions of the developing hypothalamus, including the MB (Kimura, S. et al. 1996; Ericson, J. et al. 1995; Pabst, O. et al. 2000). The MB and several ventromedial nuclei of the caudal hypothalamus do not develop in embryos with a loss of *Nkx2.1*, suggesting that it is required to specify the whole ventrocaudal hypothalamic anlage (Kimura, S. et al. 1996; Marin, O. et al. 2002). The fact that the MB domain of *Sim1* expression is dramatically reduced in *Nkx2.1* mutant embryos as early as E11.5 indicates that *Nkx2.1* functions upstream of *Sim1* for MB development (Marin, O. et al. 2002). Consistent with this conclusion are our observations that *Sim1* and *Sim2* are not required for the generation and initial differentiation of MB neurons, and that *Nkx2.1* expression is not affected by the loss of both *Sim1* and *Sim2*. Similarly, *Nkx2.2*, a close homolog of *Nkx2.1*, is required for *Sim1* expression in the developing ventral spinal cord, whereas *Nkx2.2* expression in this region is not affected by the loss of *Sim1* (Briscoe, J. et al. 1999; Briscoe, J. et al. 2000). Collectively, these observations suggest the existence of homologous pathways in these two ventral regions of the CNS, along which the NKX2 and SIM genes would act.

We have found that *Foxb1* expression is greatly reduced in the MB of *Sim1/Sim2* double mutants. This observation raises the possibility that *Foxb1* mediates the effect of a decrease of *Sim1/Sim2* on MB axonal guidance. However, *Foxb1* mutant analysis does not support this possibility, as the loss of *Foxb1* function only affects MTT development (Alvarez-Bolado, G. et al. 2000). Consistently, chimera analyses suggest that *Foxb1* is required in the dorsal thalamus for MTT formation. Moreover, we did not observe a decrease of *Foxb1* expression in embryos with at least one allele of *Sim1/Sim2*, despite the fact that axonal guidance abnormalities are observed in these embryos. The loss of *Foxb1*, however, might suggest that *Sim1* and *Sim2* are required to control aspects of MB differentiation other than axonal growth that were not revealed by our analysis.

Respective functions of bHLH-PAS proteins during MB development

The basic HLH and PAS domains of SIM1 and SIM2 share high identity, whereas their carboxy-terminal domains are poorly conserved. Consistent with the low identity of their carboxy termini, SIM1 and SIM2 display distinct transcriptional properties in cultured cell systems. The SIM1;ARNT(2) heterodimer transactivates reporter constructs via the ARNT carboxy terminus (Moffett, P. and Pelletier, J. 2000; Woods, S. L. and Whitelaw, M. L. 2002). SIM1 has neither activation nor repression activity in this context. By contrast, SIM2;ARNT(2) activates transcription only when the carboxy terminus of SIM2 is deleted. The carboxy terminus of SIM2 appears to have a repressive function, which quenches the transactivating activity of ARNT (Moffett, P. and Pelletier, J. 2000; Woods, S. L. and Whitelaw, M. L. 2002). Because SIM1 and SIM2 compete for binding to ARNT(2) and to the DNA-binding site, these different properties of SIM1 and SIM2 result in some transcriptional antagonism, at least in vitro (Moffett, P. and Pelletier, J. 2000).

Our study indicates, however, that *Sim1* and *Sim2* can compensate for the absence of each other, the former playing a predominant role over the latter during MB development. We did not observe a reduction of *Sim2* expression in the MB of *Sim1*^{-/-}

embryos, or vice versa, suggesting that the interaction between *Sim1* and *Sim2* is not hierarchical. All together, these results indicate that *Sim1* and *Sim2* can play similar roles in vivo, even though their C termini have diverged considerably. There are other lines of evidence supporting this conclusion. Overexpression of *Sim1* or *Sim2* using a *Wnt1* enhancer activates *Shh* expression in the mouse midbrain, demonstrating that *Sim1* and *Sim2* can act similarly in a given embryonic context (Epstein, D. J. et al. 2000). Moreover, *Sim1* can compensate for the absence of *Sim2*, albeit ineffectively, during differentiation of the PVN. The interplay between *Sim1* and *Sim2* is, however, complex in the developing PVN, as mutant analysis indicates that they also control different aspects of PVN neuronal differentiation and that *Sim1* is required for *Sim2* expression (Goshu, E. et al. 2004). Recent studies provide other examples of interaction among bHLH-PAS proteins during development. For instance, *dysfusion* downregulates *tracheiless* expression in the developing trachea of the fly, and NXF competes with SIM2 for binding to elements that regulate the expression of a gene engaged in dendritic-cytoskeleton modulation at synapses (Jiang, L. and Crews, S. T. 2003; Ooe, N. et al. 2004). It will be interesting to determine whether these or other bHLH-PAS proteins interact with *Sim1/Sim2* during the development of the MB.

Biochemical, expression and mutant studies indicate that ARNT2 is required for PVN development by acting as the dimerizing partner of SIM1. It appears likely that SIM2 also heterodimerizes with ARNT2 in the PVN, as they can physically interact (Goshu, E. et al. 2004). However, because the PVN phenotype of *Arnt2*^{-/-} mice is identical to that of *Sim1*^{-/-} mice, and is more severe than that of *Sim2*^{-/-} mice, it has not been formally shown that SIM2 controls PVN neuronal differentiation through this interaction. Surprisingly, histological analysis suggests that MB axonal tracts can develop in the absence of *Arnt2*. A homologue, *Arnt*, could compensate for the absence of *Arnt2*, but its expression level is particularly low in the MB of wild-type and *Arnt2* mutant embryos (A.C. and J.L.M., unpublished). Alternatively, SIM1 and SIM2 could dimerize with a member of another subgroup of partners, such as BMAL1 or BMAL2, raising the possibility that the use of different partners could influence the function of SIM1/SIM2. Such heterogeneity in the composition of the SIM1 and SIM2 complexes

could account for the discrepancy between their respective in vivo and in vitro transcriptional activities.

Acknowledgments

We wish to thank Chen-Ming Fan for his help with the production of the *Sim1tlz* mice and for his critical reading of the manuscript. We are grateful to Dr Bernadette Holdener for her generous gifts of *C112k* embryos. This work was supported by an operating grant (MOP-15458) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). J.L.M. is a clinician-scientist of the CIHR.

References:

- Allen, G. V. and Hopkins, D. A. (1990) Topography and synaptology of mamillary body projections to the mesencephalon and pons in the rat. *J. Comp. Neurol.* 301: 214-231.
- Altman, J. and Bayer, S. A. (1978) Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 182: 945-971.
- Alvarez-Bolado, G., Zhou, X., Voss, A. K., Thomas, T. and Gruss, P. (2000) Winged helix transcription factor *Foxb1* is essential for access of mammillothalamic axons to the thalamus. *Development* 127: 1029-1038.
- Bagri, A., Marin, O., Plump, A. S., Mak, J., Pleasure, S. J., Rubenstein, J. L. and Tessier-Lavigne, M. (2002) Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33: 233-248.
- Briscoe, J., Sussel, L., Serup, P., Hartigan-O'Connor, D., Jessell, T. M., Rubenstein, J. L. and Ericson, J. (1999) Homeobox gene *Nkx2.2* and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398: 622-627.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M. and Ericson, J. (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101: 435-445.
- Crowner, D., Madden, K., Goeke, S. and Giniger, E. (2002) *Lola* regulates midline crossing of CNS axons in *Drosophila*. *Development* 129: 1317-1325.
- Cruce, J. A. (1977) An autoradiographic study of the descending connections of the mammillary nuclei of the rat. *J. Comp. Neurol* 176: 631-644.

- Easter, S. S., Jr, Ross, L. S. and Frankfurter, A. (1993) Initial tract formation in the mouse brain. *J. Neurosci.* 1: 285-299.
- Epstein, D. J., Martinu, L., Michaud, J. L., Losos, K. M., Fan, C. And Joyner, A. L. (2000) Members of the bHLH-PAS family regulate Shh transcription in forebrain regions of the mouse CNS. *Development* 127: 4701-4709.
- Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T. M. and Edlund, T. (1995) Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81: 747-756.
- Fan, C.-M., Kuwana, E., Bulfone, A., Fletcher, C. F., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Crews, S., Martinez, S., Puellas, L., Rubenstine, J. et al. (1996) Expression patterns of two murine homologs of *Drosophila* Singleminded suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 1-16.
- Giger, R. J. and Kolodkin, A. L. (2001) Silencing the siren: guidance cue hierarchies at the CNS midline. *Cell* 105: 1-4.
- Goshu, E., Jin, H., Lovejoy, J., Marion, J. F., Michaud, J. L. and Fan, C. M. (2004) Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol. Endocrinol.* 18: 1251-1262.
- Hayakawa, T. and Zyo, K. (1989) Retrograde double-labeling study of the mammillothalamic and the mammillotegmental projections in the rat. *J. Comp. Neurol.* 284: 1-11.
- Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fuji, H., Saijoh, Y., Gotoh, O., Sogawa, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (1996) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic Helix-Loop- Helix/PAS factor (ARNT2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). *Mol. Cell. Biol.* 16: 1706-1713.

- Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A. and Hankinson, O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252: 954-958.
- Hogenesch, J. B., Chan, W. K., Jackiw, V. H., Brown, R. C., Gu, Y.-Z. G., Pray-Grant, M., Perdew, G. H. and Bradfield, C. A. (1997) Characterization of a subset of the basic-Helix-Loop-Helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J. Biol.Chem.* 272: 8581-8593.
- Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Moran, S. M., Shimomura, K., Radcliffe, L. A., Takahashi, J. S. and Bradfield, C. A. (2000) The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J. Neurosci.* 20: RC83.
- Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawauchi, S., Ema, M., Yamamoto, M. and Fujii-Kuriyama, Y. (2001) Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes Cells* 6: 361-374.
- Ikeda, M. and Nomura, M. (1997) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS protein (BMAL1) and identification of alternatively spliced variants with alternative translation initiation site usage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 258-264.
- Ikeda, M., Yu, W., Hirai, M., Ebisawa, T., Honma, S., Yoshimura, K., Honma, K. I. and Nomura, M. (2000) cDNA cloning of a novel bHLHPAS transcription factor superfamily gene, BMAL2: its mRNA expression, subcellular distribution, and chromosomal localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 493-502.
- Jiang, L. and Crews, S. T. (2003) The *Drosophila* dysfusion basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS gene controls tracheal fusion and levels of the trachealess bHLH-PAS protein. *Mol. Cell. Biol.* 23: 5625-5637.

- Kawano, H., Horie, M., Honma, S., Kawamura, K., Takeuchi, K. And Kimura, S. (2003) Aberrant trajectory of ascending dopaminergic pathway in mice lacking Nkx2.1. *Exp. Neurol.* 182: 103-112.
- Keith, B., Adelman, D. M. and Simon, M. C. (2001) Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6692-6697.
- Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C. H., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J. (1996) The T/ebp null mouse: thyroidspecific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev.* 10: 60-69.
- Maemura, K., de la Monte, S. M., Chin, M. T., Layne, M. D., Hsieh, C. M., Yet, S. F., Perrella, M. A. and Lee, M. E. (2000) CLIF, a novel cyclelike factor, regulates the circadian oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *J. Biol. Chem.* 275: 36847-36851.
- Marillat, V., Sabathier, C., Failli, V., Matsunaga, E., Sotelo, C., Tessier-Lavigne, M. and Chédotal, A. (2004) The Slit receptor Rig-1/Robo3 controls midline crossing by hindbrain precerebellar neurons and axons. *Neuron* 43: 69-79.
- Marin, O., Baker, J., Puellas, L. and Rubenstein, J. L. (2002) Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development* 129: 761-773.
- Mastick, G. S. and Easter, S. S., Jr (1996) Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Dev. Biol.* 173: 79-94.
- Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R. and Fan, C.-M. (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 12: 3264-3275.

- Michaud, J. L., DeRossi, C., May, N. R., Holdener, B. C. and Fan, C.-M. (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech. Dev.* 90: 253-261.
- Moffett, P. and Pelletier, J. (2000) Different transcriptional properties of mSim-1 and mSim-2. *FEBS Lett.* 466: 80-86.
- Ooe, N., Saito, K., Mikami, N., Nakatuka, I. and Kaneko, H. (2004) Identification of a novel basic helix-loop-helix-PAS factor, NXF, reveals a Sim2 competitive, positive regulatory role in dendritic-cytoskeleton modulator drebrin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 24: 608-616.
- Okano, T., Sasaki, M. and Fukada, Y. (2001) Cloning of mouse BMAL2 and its daily expression profile in the suprachiasmatic nucleus: a remarkable acceleration of Bmal2 sequence divergence after Bmal gene duplication. *Neurosci. Lett.* 300: 111-114.
- Pabst, O., Herbrand, H., Takuma, N. and Arnold, H. H. (2000) NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesendodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos. *Dev. Genes Evol.* 210: 47-50.
- Pielage, J., Steffes, G., Lau, D. C., Parente, B. A., Crews, S. T., Strauss, R. and Klambt, C. (2002) Novel behavioral and developmental defects associated with *Drosophila* single-minded. *Dev. Biol.* 249: 283-299.
- Sabatier, C., Plump, A. S., Ma, L., Brose, F., Lee, E. Y. H. P. and Tessier-Lavigne, M. (2004) The divergent Robo family protein Rig-1/Robo3 is a negative regulator of Slit responsiveness required for midline crossing by commissural axons. *Cell* 117: 157-169.
- Sharp, P. E., Blair, H. T. and Cho, J. (2001) The anatomical and computational basis of the rat head-direction cell signal. *Trends Neurosci.* 24: 289-294.
- Takahata, S., Sogawa, K., Kobayashi, A., Ema, M., Mimura, J., Ozaki, N. and Fujii-Kuriyama, Y. (1998) Transcriptionally active heterodimer formation of an

- Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248 : 789-794.
- Valverde, F., Garcia, C., Lopez-Mascaraque, L. and De Carlos, J. A. (2000) Development of the mammillothalamic tract in normal and Pax-6 mutant mice. *J. Comp. Neurol.* 419: 485-504.
- Van der Kooy, D., Kuypers, H. G. J. M. and Catsman-Berrevoets, C. E. (1978) Single mammillary body cells with divergent axon collaterals. Demonstration by a simple, fluorescent retrograde double labeling technique in the rat. *Brain Res.* 158: 189-196.
- Vann, S. D. and Aggleton, J. P. (2003) Evidence of a spatial encoding deficit in rats with lesions of the mammillary bodies or mammillothalamic tract. *J. Neurosci.* 23: 3506-3514.
- Vann, S. D. and Aggleton, J. P. (2004) The mammillary bodies: two memory systems in one? *Nat. Rev. Neurosci.* 5: 35-44.
- Wharton, K. A., Jr and Crews, S. T. (1993) CNS midline enhancers of the *Drosophila* slit and Toll genes. *Mech. Dev.* 40: 141-154.
- Wolting, C. D. and McGlade, C. J. (1998) Cloning and chromosomal localization of a new member of the bHLH/PAS transcription factor family. *Mamm. Genome* 9: 463-468.
- Woods, S. L. and Whitelaw, M. L. (2002) Differential activities of murine single minded 1 (SIM1) and SIM2 on a hypoxic response element. Crosstalk between basic helix-loop-helix/per- Arnt-Sim homology transcription factors. *J. Biol. Chem.* 277: 10236-10243.

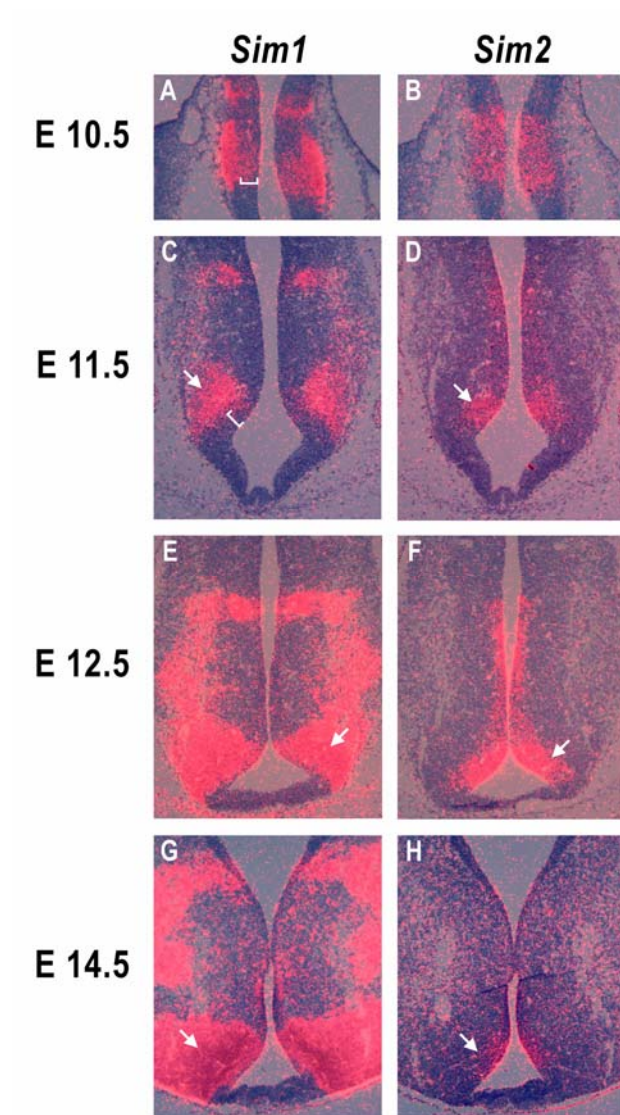


Figure 1.

Figure 1. Co-expression of *Sim1* and *Sim2* in the developing mammillary body. Adjacent coronal sections through the prospective MB of E10.5 (A, B), E11.5 (C, D), E12.5 (E, F) and E14.5 (G, H) wildtype embryos were hybridized either with *Sim1* (A, C, E, G) or *Sim2* (B, D, F, H). (A, B) At E10.5, *Sim1* is expressed in the lateral aspect of the neuroepithelium, which presumably corresponds to the mantle layer, but is expressed less strongly in the medial aspect (bracket), which corresponds to the ventricular layer (A). *Sim2* is mainly expressed in this medial domain (B). (C-F) At E11.5 and E12.5, *Sim1* is expressed strongly in the mantle layer, which corresponds to the prospective MB, but also weakly in the ventricular layer (bracket, C). *Sim2* is expressed in the ventricular layer and in the medial aspect of the mantle layer of the prospective MB. (G, H) At E14.5, *Sim1* shows the same expression pattern. However, *Sim2* expression has decreased in intensity and becomes restricted to the ventricular layer. The arrows indicate the domains of *Sim1/Sim2* expression in the prospective MB.

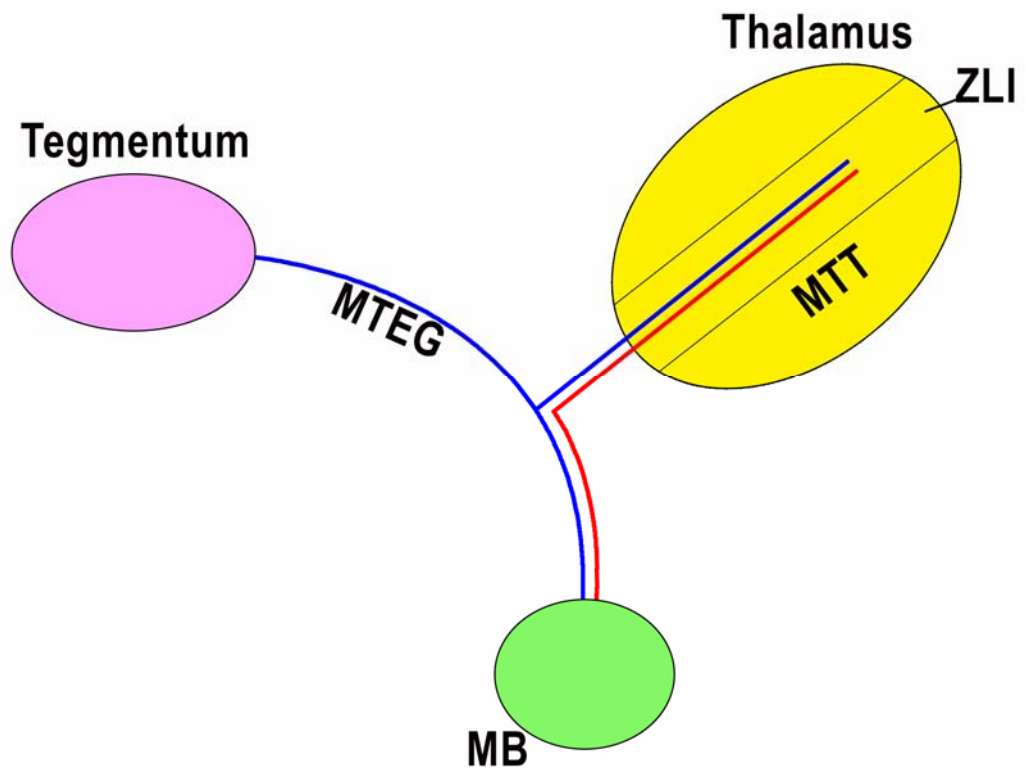


Figure 2.

Figure 2. Organization of the mammillary body projections. The left side of the brain is shown from a sagittal perspective. Rostral is to the right. The principal mammillary tract (PMT) gives rise to the mammillotegmental (MTEG) and mammillothalamic tract (MTT).

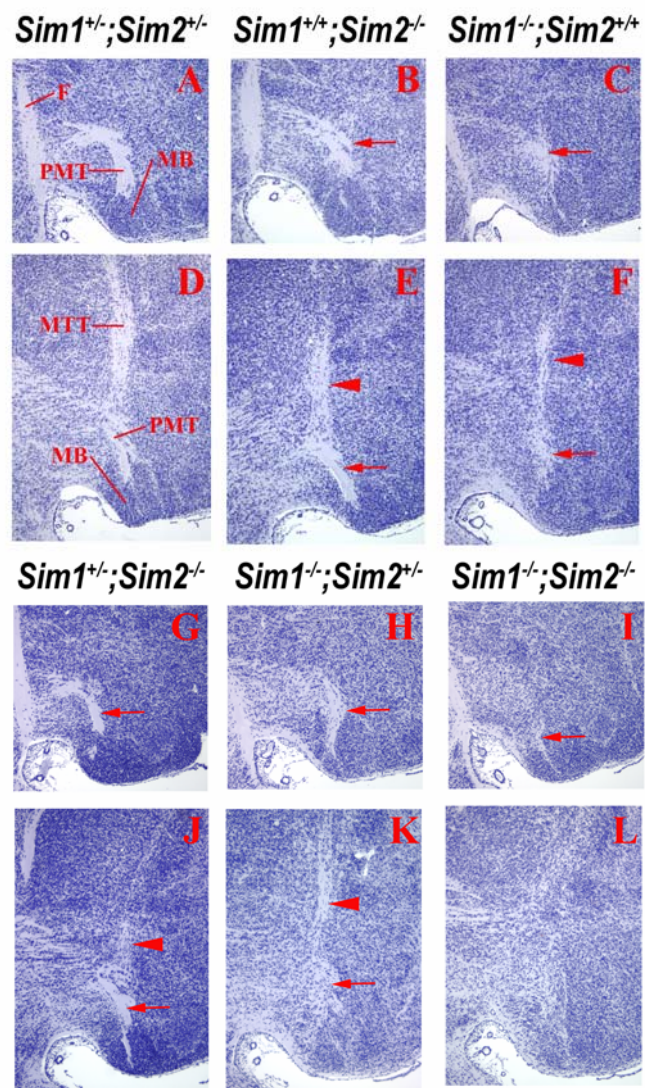


Figure 3.

Figure 3. MTEG and MTT development affected by *Sim1/Sim2* gene dosage. E18.5 brains of various genotypes were sectioned sagittally and stained with Haematoxylin. The upper panels (A-C, G-I) represent medial sections containing the PMT, whereas the lower panels correspond to lateral sections that include the MTT and the PMT. The MTEG is not readily detectable on sagittal sections because of its orientation. The PMT is indicated by arrows, the MTT by arrowheads. The PMT and MTT are well developed in *Sim1^{+/-};Sim2^{+/-}* (A, D) and *Sim1^{+/+};Sim2^{-/-}* (B, E) embryos, whereas they are thinner in *Sim1^{-/-};Sim2^{+/+}* (C, F), *Sim1^{+/-};Sim2^{-/-}* (G, J) and *Sim1^{-/-};Sim2^{+/-}* (H, K) embryos. The PMT and MTT were barely detectable in *Sim1^{-/-};Sim2^{-/-}* embryos (I, L). In all cases, the MB was histologically present.

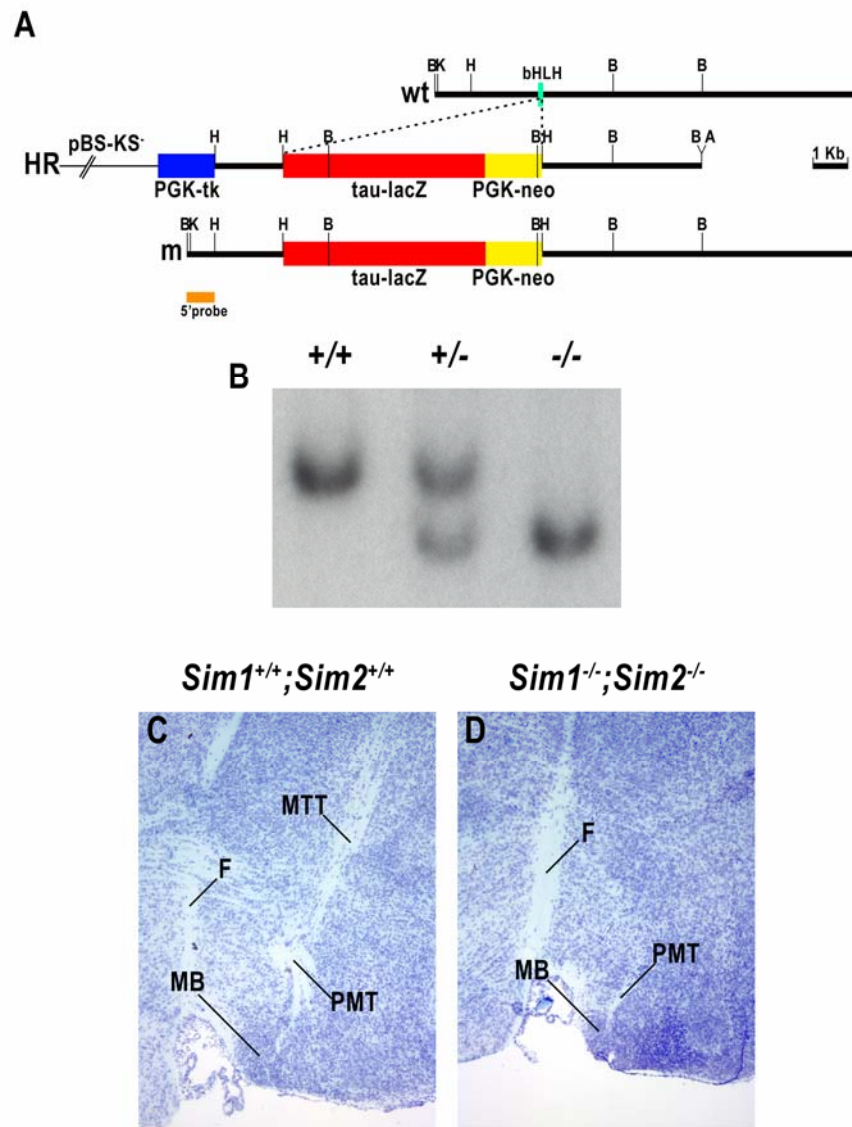


Figure 4.

Figure 4. Creation of a *Sim1* allele expressing *Tau-lacZ*. (A) Schematic representation of the *Sim1* locus (wt), of the targeting vector (HR), and of the *Sim1* mutant allele (m). Homologous recombination replaces the initiation codon and the basic HLH domain with a *Tau-lacZ* fusion gene. The 5' external probe is indicated. B, *Bam*HI; H, *Hind*III. (B) Southern blot analysis of genomic DNA from *Sim1*^{+/+}, *Sim1*^{tlz/+} and *Sim1*^{tlz/tlz} mice. The 5' probe detects a wild-type 5.2-kb *Bam*HI fragment and a mutant 4.5-kb *Bam*HI fragment. (C, D) Sagittal sections through the MB of *Sim1*^{+/+};*Sim2*^{+/+} and *Sim1*^{tlz/tlz};*Sim2*^{-/-} E18.5 embryos that have been stained with Haematoxylin. The MTT and the PMT are not detectable in the MB of embryos homozygous for the *Sim1*⁻ (C) or the *Sim1*^{tlz} (D) allele.

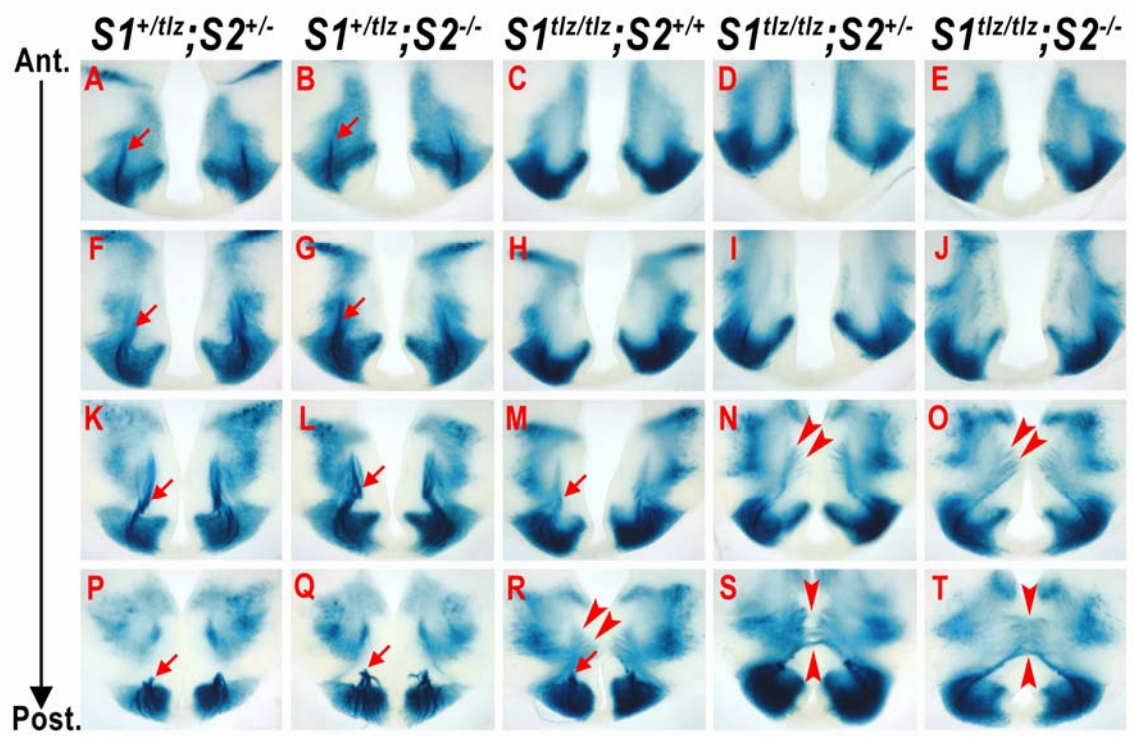


Figure 5.

Figure 5. β -galactosidase staining of mammillary body axonal projections in E14.5 *Sim1/Sim2* mutant embryos. E14.5 brains of various genotypes were stained for β -galactosidase activity and sectioned coronally. For each brain, four consecutive sections are shown, the most anterior being at the top of the figure. PMTs are indicated by arrows, whereas the abnormally targeted axons are indicated by arrowheads. The loss of *Sim1* function is associated with a decrease of the PMT and the emergence of MB axons directed towards the midline. *Sim2* also contributes to this phenotype, as the axonal abnormalities are more severe in *Sim1^{tlz/tlz};Sim2^{-/-}* than in *Sim1^{tlz/tlz};Sim2^{+/+}* embryos.

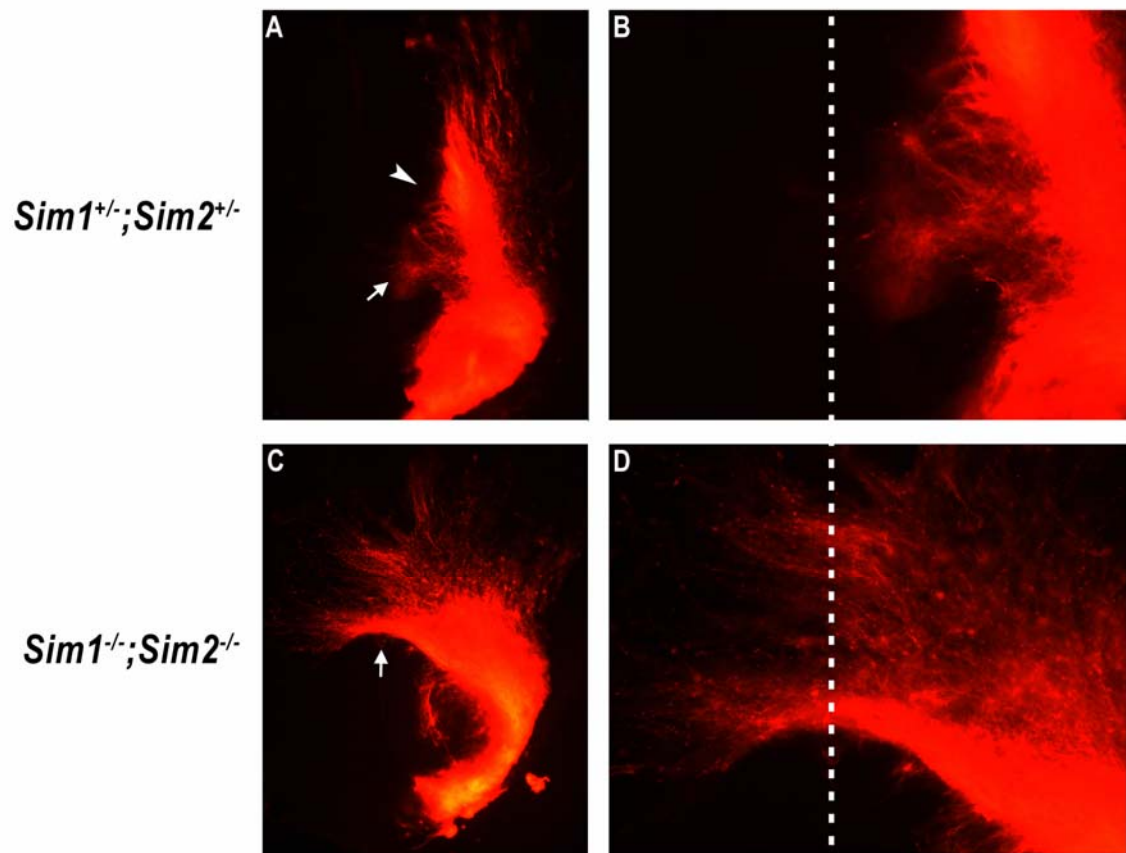


Figure 6.

Figure 6. Abnormal targeting of mammillary body axons as revealed by DiI labelling. Crystals of DiI were inserted into E14.5 brains of *Sim1*^{+/-};*Sim2*^{+/-} (A, B) and *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{-/-} (C, D) embryos, and the brains sectioned after an incubation period of 2 weeks. (B, D) Higher magnification images of A (B) and C (D). The white line in B and D corresponds to the midline. The PMT (arrowhead) is recognizable in *Sim1*^{+/-};*Sim2*^{+/-} but not in the double mutant. A few axons appear to progress towards the midline in *Sim1*^{+/-};*Sim2*^{+/-} embryos (arrow), whereas the majority of them do so in *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{-/-} embryos.

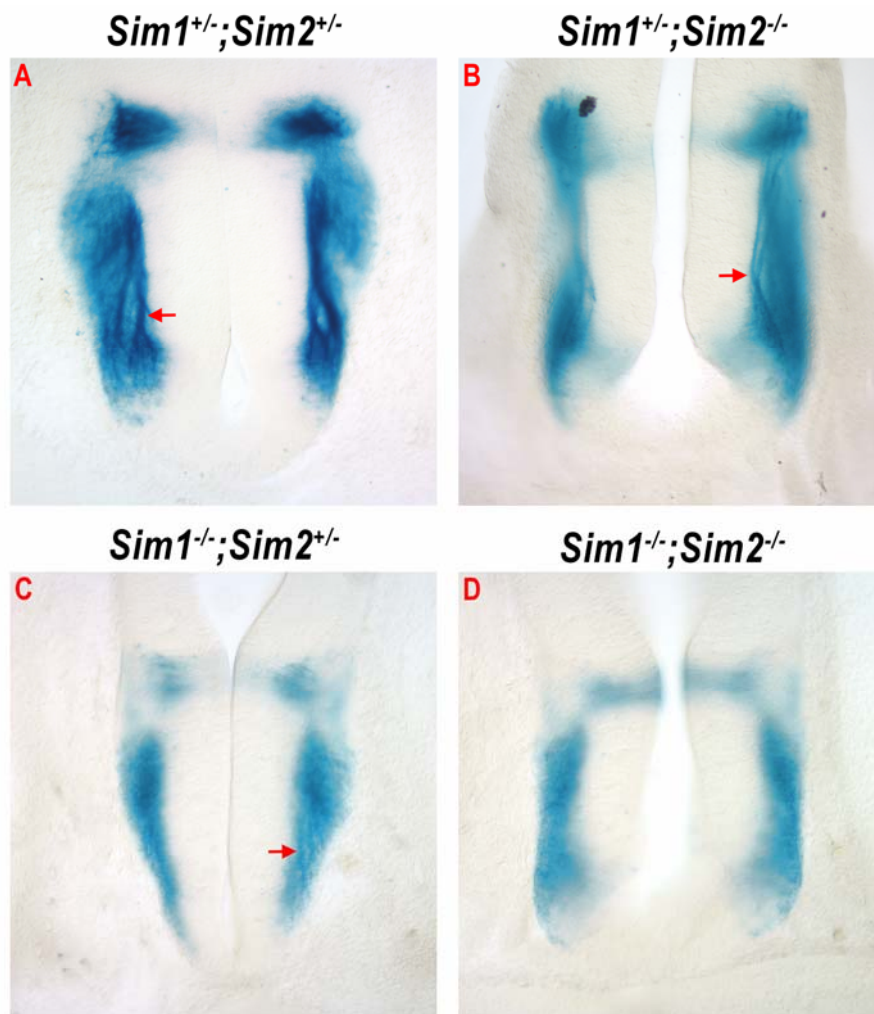


Figure 7.

Figure 7. β -galactosidase staining of mammillary body axonal projections in E11.5 *Sim1/Sim2* mutant embryos. E11.5 brains with various genotypes, as indicated, were stained for β -galactosidase activity and sectioned coronally. Axonal bundles (arrows) are easily recognizable in *Sim1^{tlz/+};Sim2^{+/-}* (A) and in *Sim1^{tlz/+};Sim2^{-/-}* (B) embryos, but are decreased in *Sim1^{tlz/-};Sim2^{+/-}* embryos (C). No bundle was detected in *Sim1^{tlz/-};Sim2^{-/-}* embryos (D). Note that axons progress in a domain that is stained. β -galactosidase staining in the dorsal domain is weaker in C and D than in A and B because these thick sections (A, B) of early embryos are from a slightly different plane.

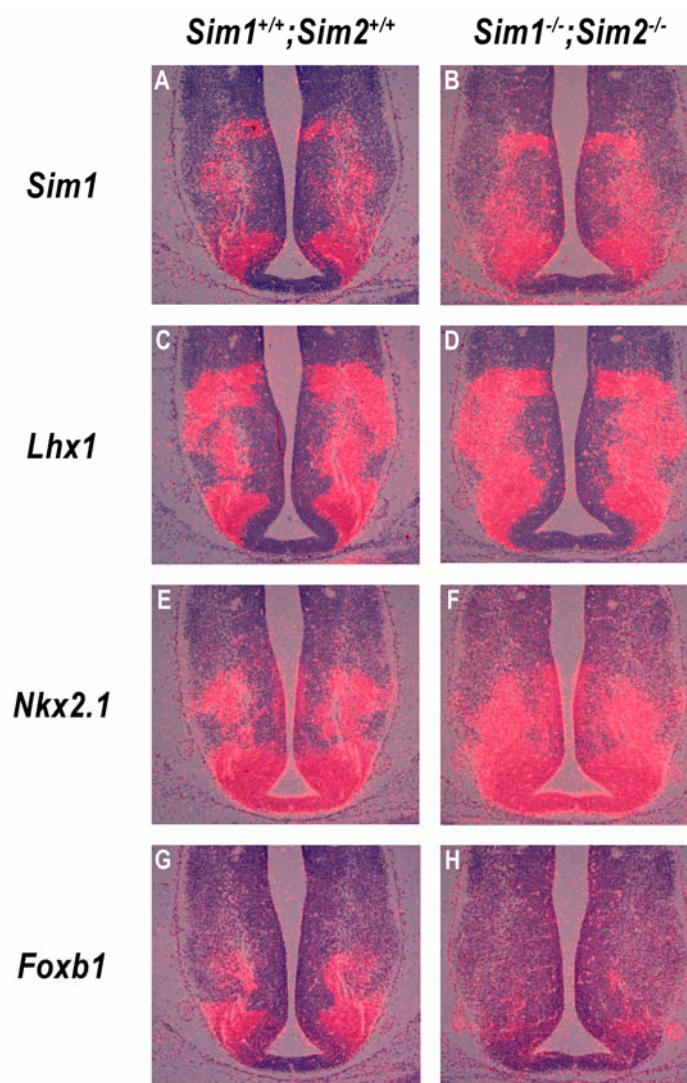


Figure 8.

Figure 8. Loss of *Foxb1* expression in E12.5 *Sim1/Sim2* double mutants. Coronal sections through the MB of E12.5 *Sim1^{+/+};Sim2^{+/+}* (A, C, E, G) and *Sim1^{-/-};Sim2^{-/-}* (B, D, F, H) embryos were hybridized either with a *Sim1* (A, B), *Lhx1* (C, D), *Nkx2.1* (E, F) or *Foxb1* (G, H) probe. The maintenance of *Sim1*, *Lhx1* and *Nkx2.1* expression in double mutants indicates that the loss of *Sim1/Sim2* does not affect the early differentiation of MB neurons. *Sim1/Sim2* are, however, required to maintain *Foxb1* expression in the MB.

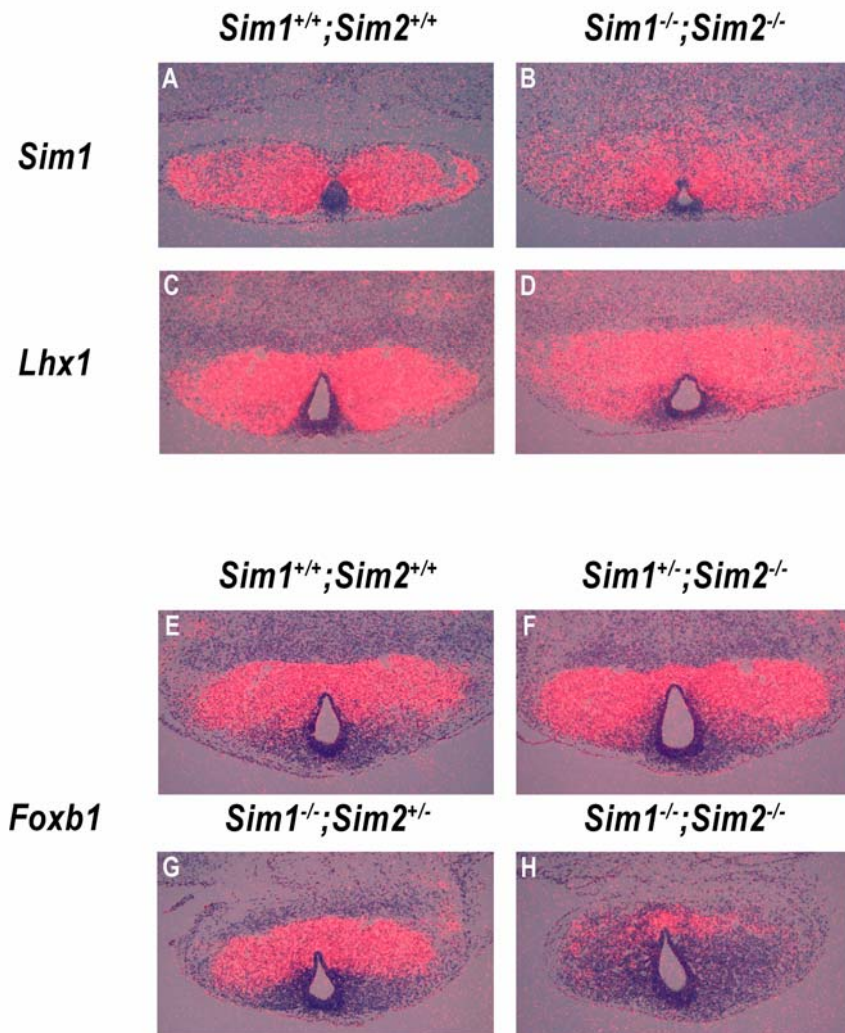


Figure 9.

Figure 9. Mammillary body neurons survive until the end of gestation in *Sim1/Sim2* double mutants. Coronal sections through the MB of E18.5 with various dosage of *Sim1/Sim2*, as indicated, hybridized with *Sim1* (A, B), *Lhx1* (C, D) and *Foxb1* (E-H) probes. *Sim1* and *Lhx1* expression is maintained in the MB of *Sim1/Sim2* double mutants. By contrast, *Foxb1* expression is dramatically reduced in *Sim1/Sim2* double mutants but not in embryos with at least one allele of *Sim1/Sim2*. Of note, the apparent smaller sizes of the MBs shown in G and H reflect different planes of section.

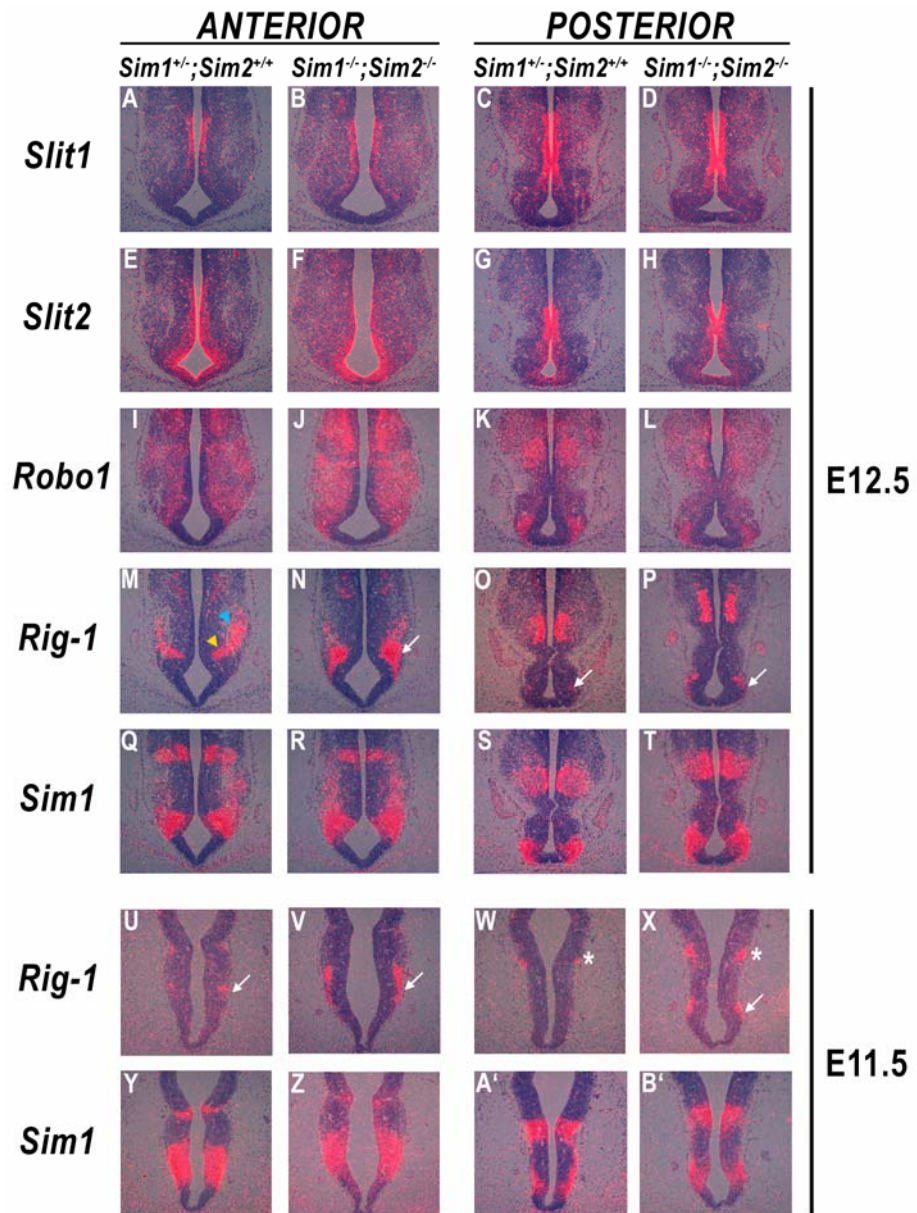


Figure 10.

Figure 10. *Sim1* and *Sim2* repress *Rig-1/Robo3* expression in the developing mammillary body. (A-T) Coronal sections through the MB of E12.5 *Sim1*^{+/-};*Sim2*^{+/+} and *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{-/-} embryos were hybridized either with a *Slit1* (A-D), *Slit2* (E-H), *Robo1* (I-L), *Rig-1/Robo3* (M-P) or *Sim1* (Q-T) probe. Sections correspond either to the anterior or posterior aspect of the MB, as indicated. The sections hybridized with the *Rig-1/Robo3* probe (M-P) are adjacent to those hybridized with the *Sim1* probe (Q-T). Expression of *Slit1*, *Slit2* and *Robo1* is similar in *Sim1*^{+/-};*Sim2*^{+/+} and *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{-/-} embryos. In the anterior MB of *Sim1*^{+/-};*Sim2*^{+/+} embryos, *Rig-1/Robo3* is expressed in a narrow region that includes a medial domain (yellow arrowhead) that is contained within the dorsal aspect of the MB *Sim1* expression domain (M, Q). In *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{-/-} embryos, *Rig-1/Robo3* expression in the prospective MB (arrow) occupies a larger area extending ventrally and laterally (N, R). *Rig-1/Robo3* expression in the region dorsal to the MB (blue arrowhead) is decreased in *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{-/-} embryos (M,N). In the posterior MB, *Rig-1/Robo3* expression is upregulated in *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{-/-} embryos (arrow) (O, P). (U-B') Coronal sections through the MB of E11.5 *Sim1*^{+/-};*Sim2*^{+/+} and *Sim1*^{-/-};*Sim2*^{-/-} embryos were hybridized either with a *Rig-1/Robo3* (U-X) or a *Sim1* (Y-B') probe. Sections correspond either to the anterior or posterior aspect of the MB, as indicated. The sections hybridized with the *Rig-1/Robo3* probe (U-X) are adjacent to those hybridized with the *Sim1* probe (Y-B'). (U, V) *Rig-1/Robo3* is ectopically expressed (V) in the MB (arrows). (W, X) Asterisks indicate a second region in which *Rig-1/Robo3* expression is upregulated (X).

Annexe II: Looking for Trouble: A Search for Developmental Defects of the Hypothalamus.

Publié dans:

Hormone Research, 64:222–230, 2005

Looking for Trouble: A Search for Developmental Defects of the Hypothalamus.

Aurore Caqueret, Chun Yang, Sabine Duplan, Francine Boucher, Jacques L. Michaud *

Research Center, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Quebec, Canada

*Correspondence: Jacques L. Michaud,

Research Center,

Hôpital Sainte-Justine,

3175 Côte Sainte-Catherine,

Montreal, Quebec,

Canada H3T 1C5

Key Words:

Hypothalamus, Developmental defects, Transcription factor, Imprinting, Energy balance

Abstract

The hypothalamus is a critical integrator of several homeostatic processes that are required for the survival of vertebrates. Disruption of the development of the hypothalamus thus has the potential of perturbing important physiological processes with lifelong consequences. We review current knowledge about how cell types are specified and circuits are formed within the developing hypothalamus. We emphasize the potential clinical impact of the perturbations of these pathways using the regulation of energy balance as a model. We predict that disruption of hypothalamic development is a common, previously unsuspected cause of disorders of homeostatic processes such as obesity and high blood pressure.

Introduction

The hypothalamus is an evolutionary ancient integrator of homeostasis that regulates basic processes such as food and water intake, energy expenditure, the response to stress, blood pressure, and reproduction. Structurally, the hypothalamus is composed of a dozen small nuclei interspaced between less defined regions. A great body of work involving physiological and genetic studies has assigned specific functions to each of these nuclei and regions (see summary in Fig. 1). In contrast, relatively little attention has been paid to how the different components of the hypothalamus are specified and connected. Understanding the development of the hypothalamus has the potential of shedding light on frequent pathological processes that can manifest even late in life. An immediate illustration of this principle is provided by classical work done on the development of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and its disruption in some conditions affecting puberty (Wray, S. 2002). Here, we review basic knowledge about other aspects of hypothalamic development focusing on how cell types are specified and axonal connections are established. The potential clinical impact of the perturbations of these pathways is illustrated using the regulation of energy balance as a model.

Patterning of the Hypothalamus by Extrinsic Signals

Axial signals provided by the mesendoderm underlying the rostral neural plate are required to divide the primordial single eye field into two eyes (Wilson, S. W. And Houart, C. 2004). Failure of this process causes holoprosencephaly, the most frequent brain malformation (Roessler, E and Muenke, M. 2003). Because these axial signals are also required to induce development of the hypothalamus between the two eyes, it is not surprising that it is either missing or lacking in structures in holoprosencephalic brains. In fact, endocrine deficiencies, caused by hypothalamic and/or pituitary dysfunction, can be the only clinical problem in milder forms of holoprosencephaly. Currently, mutations in eight genes have been shown to cause holoprosencephaly in humans (Ming, J. E. And Muenke, M. 2002). Three of these genes (*SHH*, *PTC1*, *GLI2*) encode members of the Sonic Hedgehog signaling pathway, whereas two others have the potential of interacting

with this pathway (*SIX3*, *ZIC2*). The other genes (*TDGF1*, *FAST1*, *TGIF*) appear to interact with the Nodal/TGF- β signaling pathway. Consistent with the pathophysiology of holoprosencephaly, SHH and Nodal are axial signals that are required for hypothalamus induction (reviewed in Wilson, S. W. And Houart, C. 2004). Interestingly, these signals also appear to function for subsequent regionalization of the hypothalamus. Although the severe midline defect observed in *Shh*- and Nodal-mutant mice precluded investigation of such a role, recent studies in fish suggest that hedgehog and Nodal signaling pattern the prospective hypothalamus into distinct domains (Ohkubo, Y et al. 2002; reviewed in Wilson, S. W. And Houart, C. 2004). Experiments performed in fish also indicate that inhibition of *Wnt* signaling in the neural plate is required, likewise, for the specification of the hypothalamus anlage and also for its regionalization (Kapsimali, M. et al. 2004). The identification of signals that regionalize the hypothalamus represents a critical step towards the elucidation of mechanisms underlying its organization into a set of small nuclei.

Another source of organizing signals for the hypothalamus is the anlage of the anterior pituitary. Coculture experiments have shown that the development of ACTH/MSH cells of the prospective arcuate nucleus (ARC), located in the ventromedial hypothalamus, is enhanced by a signal provided by the Rathke's pouch (Daikoku, S. Et al. 1983). Also, Hermes et al. (Hermesz, E. et al. 2003) have characterized a *Hesx1* regulatory element that directs the expression of a reporter transgene in the ventral hypothalamus of mice, in a region that lies in direct contact with Rathke's pouch (Hermesz, E. et al 2003). In tissue recombination experiments, the pouch can induce expression of the transgene in the neurectoderm isolated from other sites of the developing forebrain, suggesting that the *Hesx1* element responds to a signal emanating from the pouch. It is not yet clear whether the signal produced by the pouch that enhance the development of ACTH/MSH cells is the same as that required for the transgene expression in the ventral hypothalamus. Based on these observations, a prediction can be made that disruption of the development of the pouch might affect the development of the ventral hypothalamus.

Transcriptional Control of Cell-Type Specification in the Hypothalamus

Differentiation of neurons typically involves cascades of transcription factors that progressively define their phenotypes. Such cascades have been characterized in cells that populate hypothalamic nuclei.

Paraventricular and Supraoptic Nuclei

The homeobox-containing transcription factor OTP and the heterodimeric complex formed by the Bhlhpas transcription factors SIM1 and ARNT2 are required for the development of (1) virtually all neurons of the paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei, including those identifiable by the production of thyrotropin-releasing hormone (TRH), corticotropin-releasing hormone (CRH), oxytocin (OT), and arginine vasopressin (AVP); (2) somatostatin (SS) parvocellular neurons of the anterior periventricular nucleus, which is contiguous to the PVN; and (3) other populations of hypothalamic TRH neurons found in the lateral areas and preoptic region (Michaud, J. L. et al. 1998; Michaud, J. L. et al. 2000; Hosoya, T. et al. 2001; Keith, B. et al. 2001; Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000) SIM1:ARNT2 and OTP function along parallel pathways to control multiple aspects of the development of these cell types, including the proliferation of their progenitors, differentiation, and migration (Michaud, J. L. et al. 1998; Michaud, J. L. et al. 2000; Hosoya, T. et al. 2001; Keith, B. et al. 2001; Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000; Caqueret et al., unpubl. data).

SIM1:ARNT2 and OTP act upstream to maintain the expression of *Brn2*, a POU domain transcription factor, and *Sim2*, a close homolog of *Sim1*, which, in turn, control the differentiation of distinct populations of hypothalamic neurons (Fig. 2). *Brn2* is required for the differentiation of CRH, OT, and AVP neurons of the PVN/SON (Schonemann, M. D. et al. 1995; Nakai, S. et al. 1995). The fact that *Brn2* regulates the activity of the *Crh* promoter in vitro suggests that it acts at the final stage of differentiation (Schonemann, M. D. et al. 1995). In contrast, these PVN populations of OT-, AVP-, and CRH-expressing cells are not affected in *Sim2*^{-/-} embryos but TRH cells as well as the SS cells of the anterior periventricular nucleus are decreased by 43

and 83%, respectively, in these embryos (Goshu, E. et al. 2004). The interplay between *Sim1* and *Sim2* is complex. *Sim1* acts upstream to maintain *Sim2* expression, but it can also compensate, albeit ineffectively, for loss of *Sim2*. It is unclear whether TRH and SS cells that require *Sim2* for their development and those that do not require *Sim2* have different properties or function.

Brn2 and *Sim2* are thus required for the differentiation of distinct cell types. The domain of *Brn2* expression is located anteriorly compared to that of *Sim2*, correlating with the spatial distribution of the cell types in which they function (Goshu, E. et al. 2004). These observations provide novel insight into the emergence of the neuronal topography of the anterior hypothalamus.

Arcuate Nucleus

The ARC is composed of distinct cell types whose identity and spatial distribution have not yet been fully resolved (Dickson, S. L. et al. 1997). Early on during development, signals produced by the axial mesendoderm induce the expression of the homeobox-containing transcription factor NKX2.1 in the overlying presumptive hypothalamus (Kimura, S. et al. 1996; Ericson, J. et al. 1995; Pabst, O. et al. 2000). In turn, *Nkx2.1* functions to specify the anlage of the ventral hypothalamus that will give rise to arcuate and the ventromedial nuclei (Kimura, S. et al. 1996; Marin, O. et al. 2002). A set of homeobox-containing transcription factors has been shown to function downstream to specify some of the cell types populating the ARC (Fig. 3). For instance, *Gsh1* is required for *Ghrh* (growth-hormone-releasing hormone) expression in the ARC, whereas in vitro studies indicate that it can regulate *Ghrh* expression directly by interacting with its promoter (Li, H. et al. 1996). *Hmx2* and *Hmx3* together are also required for *Ghrh* expression, at least in part, by maintaining *Gsh1* expression (Wang, W. et al. 2004). *Otp* affects the development of another cell type in the ARC identifiable by the production of SS (Acampora, D. et al. 1999; Wang, W. and Lufkin, T. 2000). As mentioned above, *Otp* also affects *Ss* expression in other regions of the diencephalon, including the anterior periventricular nucleus and zona incerta. It is likely that *Gsh1*, *Hmx2/Hmx3*, and *Otp* not only function to regulate the expression of *Ghrh* and *Ss*, but

also have a more global impact on the differentiation of the cells in which they are expressed.

Ventromedial Nucleus

Steroidogenic factor 1 (SF1), an orphan member of the nuclear receptor family, is required for the development of several endocrine systems. *Sfl*-homozygous mice lack gonads and adrenals and have impaired function of pituitary gonadotropes (Shinoda, K. et al. 1995; Ingraham, H. A. et al. 1994). The only site of *Sfl* expression in the brain is the ventromedial nucleus (VMN). The VMN of *Sfl*^{-/-} embryos, but not of heterozygotes, shows a complex phenotype (Shinoda, K. et al. 1995; Dellovade, T. L. et al. 2000; Ikeda, Y. et al. 1995; Majdic, G. et al. 2002; Tran, P. V. et al. 2003; Davis, A. M. et al. 2004). VMN-mutant neurons are generated during development in appropriate number but their spatial distribution is altered with more neurons located medially and dorsally (Tran, P. V. et al. 2003; Davis, A. M. et al. 2004). The fact that the axonal projections originating from the VMN are absent in these mutants suggest that *Sfl* not only affects migration of neurons but also their differentiation.

Physiological Relevance of Transcriptional Regulators of Hypothalamus

Development

Loss of all known regulators of PVN/SON development – *Sim1*, *Arnt2*, *Otp*, *Brn2* and *Sim2* – in mice result in perinatal lethality. The severe PVN/SON defects found in mutants, such as *Sim1* or *Otp*, might underlie their lethality. In contrast, *Sim1*^{+/-} mice survive and develop early onset obesity, with increased linear growth, hyperinsulinemia, and hyperleptinemia. These mice are hyperphagic, even before they show increased weight gain (Michaud, J. L. et al. 2001; Holder, J. L. Jr et al. 2004). A balanced translocation interrupting *SIMI* was found in a child with a similar phenotype (Holder, J. L. Jr et al. 2000). Like *Sim1*^{+/-} mice, this child had early onset obesity, increased linear growth, and a voracious appetite, suggestive of hyperphagia. Mouse models suggest that *SIMI* haploinsufficiency is responsible for the obesity in this child. The description of morbid obesity in children with chromosomal deletions in the 6q16

region, which contains *SIMI*, further strengthens this conclusion (Villa, A. et al. 1995; Turleau, C. et al. 1988; Gilhuis, H. J. et al. 2000). Interestingly, a genome-wide search for childhood obesity traits has shown significant linkage on chromosome 6q22–q23, near the *SIMI* locus (Meyre, D. et al. 2004). The mechanisms underlying the hyperphagia associated with *Sim1* haploinsufficiency are still under investigation. One possibility is that dysfunction of the PVN causes this hyperphagia (Fig. 1). This dysfunction could be of developmental origin. Indeed, the PVN of *Sim1*^{+/-} mice is hypocellular, containing 24% fewer cells (Michaud, J. L. et al. 2001). However, since *Sim1* and its dimerizing partner *Arnt2* are expressed continuously in the postnatal PVN, the possibility that *Sim1* controls food intake physiologically is not excluded.

Brn2 is also expressed in the postnatal PVN/SON. The regulation of *Crh* expression by *Brn2* in cultured cells and the fact that *Avp* and *Ot* mRNA levels are reduced in *Brn2*-heterozygous mice raise the possibility that *Brn2* participates in physiological processes by controlling the expression of these effectors dynamically (Schonemann, M. D. et al. 1995; Nakai, S. et al. 1995). However, overexpression of *Brn2* in the PVN using adenoviral vectors does not affect expression levels of *Avp* and *Crh* (Wong, L. F. And Murphy, D. 2003). Also, the expression of *Brn2* is not changed in a stress model associated with increased production of CRH (Kovacs, K. J. and Sawchenko, P. E. 1996). Nevertheless, the possibility that *Brn2* regulates *Crh* expression in the postnatal PVN/SON in response to specific stimuli needs further exploration. For instance, it has been shown that *Brn2* overexpression is not sufficient per se to induce *CRH* expression but is required for retinoic acid-induced *CRH* expression in a neuroblastoma cell line (Ramkumar, T. and Adler, S. A. 1999).

Sfl^{-/-} mice can be rescued from adrenal insufficiency at birth by corticosterone replacement or adrenal transplantation (Madjic, G. et al 2002). These rescued mice show increased weight gain by 8 weeks of age and eventually weighed almost twice as much as wild-type controls. *Sfl*^{-/-} mice are not hyperphagic but show decreased locomotor activity. This model will be useful for the dissection of the role of VMN in the regulation of energy balance.

Establishment of Circuitries

During development, attractive and repulsive cues guide axons towards their targets. Very little, however, is known about the molecules that guide hypothalamic axons. Recent studies have shed some light on how one set of axons, those originating from GnRH neurons, reach their target. GnRH neurons originate from the olfactory epithelium, migrate following olfactory/vomer nasal axons and settle in a continuum from the olfactory bulbs to the hypothalamus. Specification and migration of GnRH neurons has been reviewed elsewhere and will not be further discussed here (Wray, S. 2002). The majority of GnRH neurons project to the median eminence (ME). Explant and transplantation studies indicate that the ME produces a diffusible attractive signal for GnRH axons (Rogers, M. C. et al. 1997). A prototypical guidance molecule is netrin-1, a secreted protein that attracts axons by interacting with its receptor DCC. Netrin-1 is produced in medial areas flanking the third ventricle in which GnRH axons progress as well as in the prospective ME, whereas GnRH neurons express DCC (Deiner, M. S. and Sretavan, D. W. 1999). Loss of netrin-1 or DCC reduces dramatically the number of GnRH axons that reach the ME, suggesting that netrin-1 is a major cue for the guidance of these axons towards their target (Deiner, M. S. and Sretavan, D. W. 1999). In contrast, CRH and AVP axons grow normally into the ME and posterior pituitary, respectively, of these mutants. Previous studies have established that dopaminergic, GHRH, and SS neurons restrict their projections to certain subregions of the ME (reviewed in Markakis, E. A. 2002). Altogether, these observations suggest the existence of a complex network of cues produced by distinct domains of the prospective ME that each attracts different sets of hypothalamic axons.

Whereas axon projections to the ME and infundibulum are established by the time of birth in rodents, recent studies indicate that this is not the case for all hypothalamic projections. Bouret et al. (Bouret, S. G. et al. 2004) have found that ARC projections to the PVN, lateral hypothalamic area, and the dorsal medial nucleus develop during the first 2 weeks of postnatal life in mice. These ARC projections are critical mediators of the action of leptin on food intake. The fact that these projections are not yet completely developed at this stage of life might explain the insensitivity of the

neonatal hypothalamus to the massive surge of leptin levels observed during the first week of life in rodents (Proulx, K. et al. 2002). Interestingly, Bouret et al. (Bouret, S. G. et al. 2004) found that leptin actually acts as a trophic signal that stimulates ARC axon outgrowth. More specifically, the density of ARC projections to the PVN, lateral hypothalamic area, and dorsal medial nucleus is decreased in leptin-deficient mice during the first 2 weeks of life, before weaning, and remains so in adulthood. Administration of leptin during the first 2 weeks, but not later in life, increases the number of ARC projections in leptin-deficient mice, which results in decreased food intake in the long term. Obesity secondary to leptin deficiency thus appears to involve a developmental component.

Interspecies comparisons of various features of neural development indicate that the brain of newborn mice is immature, corresponding to that of human fetuses at the beginning of the third trimester of pregnancy (Gluckman, P. D. 1981; Clancy, B. et al. 2001; Avishai-Eliner, S. et al. 2002). From a clinical point of view, factors that modulate levels of leptin in human fetuses or premature babies would thus be predicted to affect the development of ARC projections, with the potential of having long-lasting effect on energy balance. Alternatively, the development of these ARC projections after birth could represent a conserved feature of mammalian development, also present in humans, that defines a phase during which food intake would not be subjected to the same regulatory circuitries than later on, possibly reflecting the need to maximize food intake in the immediate postnatal period.

Projections of parvocellular OT neurons of the PVN to the dorsal vagal complex, a group of brainstem nuclei that comprises the dorsal motor nucleus of the vagus and the nucleus of the solitary tract, also increases during the first 2 weeks of postnatal life in rodents (Rinaman, L. 2003). These axons have also been shown to mediate in part the effect of leptin on food intake (Blevins, J. E. et al. 2004). An interesting possibility will be that the development of these projections is also stimulated by leptin during the first weeks of life. A functional correlate of the immaturity of this circuit has been proposed by Rinaman (Rinaman, L. 2003). There is good evidence that OT-containing projections

from the PVN to the dorsal vagal complex are required for the anorexic response that accompanies dehydration (Rinaman, L. et al. 2005). Interestingly, this response does not emerge until after the first 2 weeks of postnatal development, possibly because of the lack of OT projections (Rinaman, L. 2003).

Imprinting and Hypothalamic Development

Analysis of chimeric embryos and mice containing normal and uniparental cells have shown that parthenogenetic (complete maternal disomy) and androgenetic (complete paternal disomy) cells contribute to complementary regions of the brain (Allen, N. D. et al. 1995; Keverne, E. B. et al. 1996). Although at 10 days of embryonic development, androgenetic cells appear widely distributed in the brain of chimeras, they subsequently become restricted to the hypothalamus. Conversely, parthogenetic cells are progressively excluded from the hypothalamus during development of chimeric brains, while they are found abundantly in the cortex. The stage during which these complementary distributions of uniparental cells are established coincides with the proliferation and differentiation of hypothalamic neural cells. This observation suggests that paternal expression of some genes is required for development of the hypothalamus.

Interestingly, at least two genes with monoallelic expression from the paternal allele, *Peg3* and *Ndn*, might be required for the development of the hypothalamus. *Peg3* is a critical regulator of several apoptotic pathways. Loss of the paternal copy of *Peg3* in mice causes a decrease of activation of the sympathetic nervous system, presumably via the hypothalamus, that is associated with lower core body temperature and metabolic activity as well as with an increase of white and brown adipose tissue (Curley, J. P. Et al. 2005). *Peg3* is expressed at high levels during the development of several regions of the hypothalamus that regulate energy balance. It is thus tempting to speculate that the loss of *Peg3* disrupts normal hypothalamic development through its role in apoptotic pathways, leading to a cascade of energy balance dysfunctions.

NDN (encoding necdin) and *MAGEL2* are two of four protein-coding genes lost in individuals with Prader-Willi syndrome (PWS), a sporadic chromosome deletion disorder characterized by hypothalamic dysfunction with hyperphagia and severe obesity (Goldstone, A. P. 2004). Necdin and *MAGEL2*, which are part of a multiprotein family related by a MAGE homology domain, are expressed in hypothalamic areas, such as the ARC and PVN, that are involved in the regulation of energy balance (Andrieu, D. et al. 2003; Lee, S. et al. 2003). Lee et al. (Lee, S. et al. 2005) have recently found that necdin physically interacts with components of the centrosomes, which play a role in organizing microtubules during axonal outgrowth. As it might be expected from this observation, axons from necdin-null neurons elongate more slowly and are less bundled when grown in culture and several axonal tracts are reduced or misrouted in the brain of necdin-null embryos (Lee, S. et al. 2005). These interesting observations raise the possibility that the hypothalamic dysfunction of PWS patients is caused by abnormal axonal connections. Hypothalamic axonal defects were not described in these mice, possibly because these projections do not form easily detectable bundles. Their visualization requires specific labeling, the use of which has not yet been reported. Another possibility is that *MAGEL2* plays a similar role during development and that disruption of hypothalamus connections are observed only when both necdin and *MAGEL2* expression is lost, explaining the lack of single mutations in PWS. Of note, necdin physically interacts with *BBS4*, one of the several genes mutated in Bardet-Biedl syndrome, raising the possibility that similar axonal defects exist in this condition also characterized by early onset obesity (Lee, S. et al. 2005). Finally, a decrease of OT and GnRH cells has been observed in hypothalamus of *Necdin* –mutant mice, also possibly contributing to PWS phenotype (Jay, P. et al. 1997).

Although loss of these genes individually does not have a dramatic effect on hypothalamic development, it is possible that the combined loss of several genes that are only expressed from the paternal allele, as found in parthenogenetic cells, could have more severe consequences, explaining the absence of these cells in chimeric hypothalamus late during development. Why then are imprinted genes required for hypothalamus development? One theory interprets imprinting as a tug-of-war between

the interests of each parent through their genome (Haig, D. 2004). Paternally derived alleles would enhance the offspring's own fitness, favoring greater maternal investment whether or not this investment occurs before or after weaning. In the context of this theory, building a functional hypothalamus would allow optimal growth and survival of offspring, which is to the advantage of the father.

Conclusion

The study of hypothalamus development can foster insight into critical physiological processes and their disorders, as it has been shown for other regulatory centers of homeostasis such as the pituitary and pancreas (Pulichino, A. M. et al. 2003; Habener, J. et al. 2005). First, pathways that control differentiation, especially at the later stages, can be maintained in mature cells for the regulation of physiological effectors, like hormones or neurotransmitters, representing critical targets for therapies. Second, subtle developmental defects affecting the number of hypothalamic cells, their differentiation, or their axonal projections have the potential of causing metabolic and physiological disorders which can be isolated and expressed relatively late in life. As discussed in this review, instances of developmental defects of the hypothalamus affecting energy balance have been reported. We predict that disruption of hypothalamic development can also cause other phenotypes, such as high blood pressure or abnormal responses to stress, that are not as readily detectable as dysregulation of energy balance in animal models. Given that small groups of hypothalamic neurons like the PNV or ARC can participate in the regulation of multiple homeostatic processes, we would also predict that disruption of a single developmental pathway could generate several phenotypes that may coexist in an animal model or in a patient.

References:

- Acampora, D., Postiglione, M. P., Avantaggiato, V., Di Bonito, M., Vaccarino, F. M., Michaud, J. L. and Simeone, A. (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev.* 13: 2787–2800.
- Allen, N. D., Logan, K., Lally, G., Drage, D. J., Norris, M. L. and Keverne, E. B. (1995) Distribution of parthenogenetic cells in the mouse brain and their influence on brain development and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10782–10786.
- Andrieu, D., Watrin, F., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Muscatelli, F. and Fernandez, P. A. (2003) Expression of the Prader-Willi gene *necdin* during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and P75NTR expression. *Gene Expr. Patterns* 3: 761–765.
- Avishai-Eliner, S., Brunson, K. L., Sandman, C. A. and Baram, T. Z. (2002) Stressed-out or in (utero)? *Trends Neurosci.* 25: 518–524.
- Billington, C. J., Briggs, J. E., Grace, M. and Levine, A. S. (1991) Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am. J. Physiol.* 260:R321–R327.
- Blevins, J. E., Schwartz, M.W. and Baskin, D. G. (2004) Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: R87-R96.
- Bouret, S. G., Draper, S. J. and Simerly, R. B. (2004) Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J. Neurosci.* 24: 2797–2805.

- Bouret, S. G., Draper, S. J. and Simerly, R. B. (2004) Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304: 108–110.
- Clancy, B., Darlington, R. B. and Finlay, B. L. (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105: 7–17.
- Cowley, M. A., Pronchuk, N., Fan, W., Dinulescu, D. M., Colmers, W. F. and Cone, R. D. (1999) Integration of NPY AGRP and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 24: 155–163.
- Curley, J. P., Pinnock, S. B., Dickson, S. L., Thresher, R., Miyoshi, N., Surani, M. A. and Keverne, E. B. (2005) Increased body fat in mice with a targeted mutation of the paternally expressed imprinted gene *Peg3*. *FASEB J.* 19: 1302–1304.
- Daikoku, S., Chikamori, M., Adachi, T., Okamura, Y., Nishiyama, T. and Tsuruo, Y. (1983) Ontogenesis of hypothalamic immunoreactive ACTH cells in vivo and in vitro: role of Rathke's pouch. *Dev. Biol.* 97: 81–88.
- Davis, A. M., Seney, M. L., Stallings, N. R., Zhao, L., Parker, K. L. and Tobet, S. A. (2004) Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J. Neurobiol.* 60: 424–436.
- Deiner, M. S. and Sretavan, D. W. (1999) Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin-1- and DCC deficient mice. *J. Neurosci.* 19: 9900–9912.
- Dellovade, T. L., Young, M., Ross, E. P., Henderson, R., Caron, K., Parker, K. and Tobet, S. A. (2000) Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. *J. Comp. Neurol.* 423: 579–589.
- Dickson, S. L. and Luckman, S. M. (1997) Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue GHreleasing peptide-6. *Endocrinology* 138:771–777.

- Elias, C. F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R. S., Bjorbaek, C., Flier, J. S., Saper, C. B. and Elmquist, J. K. (1999) Leptin differentially regulated NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23: 775–786.
- Elmquist, J. K., Elias, C. F. and Saper, C. B. (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221–232.
- Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T. M. and Edlund, T. (1995) Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81: 747–756.
- Fan, W., Boston, B. A., Kesterson, R. A., Hruby, V. J. and Cone, R. D. (1997) Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385: 165–168.
- Gilhuis, H. J., Van Ravenswaaij, C. M., Hamel, B. J. and Gabreels, F. J. (2000) Interstitial 6q deletion with a Prader-Willi-like phenotype: a new case and review of the literature. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 4: 39–43.
- Gluckman, P. D. (1981) Maturation of hypothalamic-pituitary function in the ovine fetus and neonate. *Ciba Found. Symp.* 86: 5–42.
- Goldstone, A. P. (2004) Prader-Willi syndrome: advances in genetic pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol. Metab.* 15: 12–20.
- Goshu, E., Jin, H., Lovejoy, J., Marion, J-F., Michaud, J. L. and Fan C-M. (2004) Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol. Endocrinol.* 18: 1251–1262.
- Graham, M., Shutter, J. R., Sarmiento, V., Sarosi, I. and Stark, K. L. (1997) Over-expression of *Agrt* leads to obesity in transgenic mice. *Nat. Genet.* 17:273–274.
- Habener, J. F., Kemp, D. M. and Thomas, M. K. (2005) Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 146: 1025–1034.

- Haig, D. (2004) Genomic imprinting and kinship: how good is the evidence? *Annu. Rev. Genet.* 38: 553–585.
- Hermesz, E., Williams-Simons, L. and Mahon, K. A. (2003) A novel inducible element activated by contact with Rathke's pouch is present in the regulatory region of the Rpx/Hesx1 homeobox gene. *Dev. Biol.* 260: 68–78.
- Holder, J. L. Jr, Butte, N. F. and Zinn, A. R. (2000) Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 9: 101–108.
- Holder, J. L. Jr, Zhang, L., Kublaoui, B. M., DiLeone, R. J., Oz, O. K., Bair, C. H., Lee, Y. H. and Zinn, A. R. (2004) Sim1 gene dosage modulates the homeostatic feeding response to increased dietary fat in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287: E105–E113.
- Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawauchi, S., Ema, M., Yamamoto, M. and Fujii-Kuriyama, Y. (2001) Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes Cells* 6: 361–374.
- Ikeda, Y., Luo, X., Abbud, R., Nilson, J. H. and Parker, K. L. (1995) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* 9: 478–486.
- Ingraham, H. A., Lala, D. S., Ikeda, Y., Luo, X., Shen, W. H., Nachtigal, M. W., Abbud, R., Nilson, J. H. and Parker, K. L. (1994) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* 8: 2302–2312.
- Jay, P., Rougeulle, C., Massacrier, A., Moncla, A., Mattei, M. G., Malzac, P., Roeckel, N., Taviaux, S., Lefranc, J. L., Cau, P., Berta, P., Lalande, M. and Muscatelli, F. (1997) The human neccdin gene NDN is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat. Genet.* 17: 357–361.

- Kapsimali, M., Caneparo, L., Houart, C. and Wilson, S. W. (2004) Inhibition of Wnt/Axin/beta-catenin pathway activity promotes ventral CNS midline tissue to adopt hypothalamic rather than floorplate identity. *Development* 131:5923–5933.
- Keith, B., Adelman, D. M. and Simon, M. C. (2001) Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (*Arnt2*) gene reveals partial redundancy with *Arnt*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6692–6697.
- Keverne, E. B., Fundele, R., Narasimha, M., Barton, S. C. and Surani, M. A. (1996) Genomic imprinting and the differential roles of parental genomes in brain development. *Brain. Res. Dev.* 92: 91–100.
- Kimura, S., Hara, Y., Pineau, T., Fernandez-Salguero, P., Fox, C. H., Ward, J. M. and Gonzalez, F. J. (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 Dev.* 10: 60–69.
- Kovacs, K. J. and Sawchenko, P. E. (1996) Sequence of stress induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J. Neurosci.* 16: 262–273.
- Kristensen, P., Judge, M. E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K. N., Wulff, B. S., Clausen, J. T., Jensen, P. B., Madsen, O. D., Vrang, N., Larsen, P. J. and Hastrup, S. (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72–76.
- Lee, S., Walker, C. L., Karten, B., Kuny, S. L., Tennesse, A. A., O'Neill, M. A. and Wevrick, R. (2005) Essential role for the Prader-Willi syndrome protein *neccin* in axonal outgrowth. *Hum. Mol. Genet.* 14: 627–637.
- Lee, S., Walker, C. L. and Wevrick, R. (2003) Prader-Willi syndrome transcripts are expressed in phenotypically significant regions of the developing mouse brain. *Gene Expr. Patterns* 3: 599–609.

- Li, H., Zeitler, P. S., Valerius, M. T., Small, K. and Potter, S. S. (1996) Gsh-1 an orphan Hox gene is required for normal pituitary development. *EMBO J.* 15: 714–724.
- Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L. S., Dobbins, R. L., Mc-Garry, J. D. and Parker, K. L. (2002) Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 143: 607–614.
- Marin, O., Baker, J., Puellas, L. and Rubenstein, J. L. (2002) Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development* 129: 761–773.
- Markakis, E. A. (2002) Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol.* 23: 257–291.
- Meyre, D., Lecoecur, C., Delplanque, J., Francke, S., Vatin, V., Durand, E., Weill, J., Dina, C. and Froguel, P. (2004) A genome-wide scan for childhood obesity associated traits in French families shows significant linkage on chromosome 6q22.31–Q23.2. *Diabetes* 53: 803–811.
- Michaud, J. L., Boucher, F., Melnyk, A., Gauthier, F., Goshu, E., Levy, E., Mitchell, G. A., Himms-Hagen, J. and Fan, C-M. (2001) *Sim1* haploinsufficiency causes hyperphagia obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum. Mol. Genet.* 10: 1465–1473.
- Michaud, J. L., DeRossi, C., May, N. R., Holdener, B. C. and Fan, C-M. (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech. Dev.* 90: 253–261.
- Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R. and Fan, C-M. (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the BHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 12: 3264–3275.
- Ming, J. E. and Muenke, M. (2002) Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1017–1032.

- Nakai, S., Kawano, H., Yudate, T., Nishi, M., Kuno, J., Nagata, A., Jishage, K., Hamada, H., Fujii, H. and Kawamura, K. (1995) The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev.* 9: 3109–3121.
- Ohkubo, Y., Chiang, C. and Rubenstein, J. L. (2002) Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4 SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 111: 1–17.
- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I. and Barsln, G. S. (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by Agouti-related protein. *Science* 278: 135–138.
- Pabst, O., Herbrand, H., Takuma, N. and Arnold, H. H. (2000) NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesendodermally derived structures depends on Sonic Hedgehog in mouse embryos. *Dev. Genes Evol.* 210: 47–50.
- Proulx, K., Richard, D. and Walker, C. D. (2002) Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology* 143:4683–4692.
- Pulichino, A. M., Vallette-Kasic, S., Couture, C., Gauthier, Y., Brue, T., David, M., Malpuech, G., Deal, C., Van Vliet, G., De Vroede, M., Riepe, F. G., Partsch, C. J., Sippell, W. G., Berberoglu, M., Atasay, B. and Drouin, J. (2003) Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev.* 17: 711–716.
- Ramkumar, T, and Adler, S. A. (1999) Requirement for the POU transcription factor Brn-2 in corticotropin-releasing hormone expression in a neuronal cell line. *Mol. Endocrinol.* 13: 1237–1248.

- Rinaman, L., Vollmer, R. R., Karam, J., Phillips, D., Li, X. and Amico, J. A. (2005) Dehydration anorexia is attenuated in oxytocin-deficient mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288:R1791–R1799.
- Rinaman, L. (2003) Postnatal development of hypothalamic inputs to the dorsal vagal complex in rats. *Physiol. Behav.* 79: 65–70.
- Roessler, E. and Muenke, M. (2003) How a hedgehog might see holoprosencephaly. *Hum. Mol. Genet.* 12:R15–R25.
- Rogers, M. C., Silverman, A. J. and Gibson, M. J. (1997) Gonadotropin-releasing hormone axons target the median eminence: in vitro evidence for diffusible chemoattractive signals from the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 138:3956–3966.
- Schonemann, M. D., Ryan, A. K., McEvelly, R. J. and O’Connell, C. A. (1995) Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor BRN2. *Genes Dev.* 9: 3122–3135.
- Shinoda, K., Lei, H., Yoshii, H., Nomura, M., Nagano, M., Shiba, H., Sasaki, H., Osawa, Y., Ninomiya, Y. and Niwa, O. (1995) Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev. Dyn.* 204: 22–29.
- Tran, P. V., Lee, M. B., Marin, O., Xu, B., Jones, K. R., Reichardt, L. F., Rubenstein, J. R. and Ingraham, H. A. (2003) Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. *Mol. Cell Neurosci.* 22: 441–453.
- Turleau, C., Demay, G., Cabanis, M. O., Lenoir, G. and de Grouchy, J. (1988) 6q1 monosomy: a distinctive syndrome. *Clin. Genet.* 34: 38–42.

- Villa, A., Urioste, M., Bofarull, J. M. and Martinez-Frias, M. L. (1995) De novo interstitial deletion Q16.2q21 on chromosome 6. *Am. J. Med. Genet.* 55: 379–383.
- Wang, W., Grimmer, J. F., Van De Water, T. R. and Lufkin, T. (2004) Hmx2 and Hmx3 homeobox genes direct development of the murine inner ear and hypothalamus and can be functionally replaced by *Drosophila* Hmx. *Dev. Cell* 7:439–453.
- Wang, W. and Lufkin, T. (2000) The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev. Biol.* 227: 432–449.
- Wilson, S. W. and Houart, C. (2004) Early steps in the development of the forebrain. *Dev. Cell* 6: 167–181.
- Wong, L. F. and Murphy, D. (2003) Adenoviral-mediated over-expression of Brn2 in the rat paraventricular nucleus: no effect on vasopressin or corticotrophin releasing factor RNA levels. *Mol. Cell Endocrinol.* 200: 165–175.
- Wray, S. (2002) Development of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Front Neuroendocrinol.* 23: 292–316.

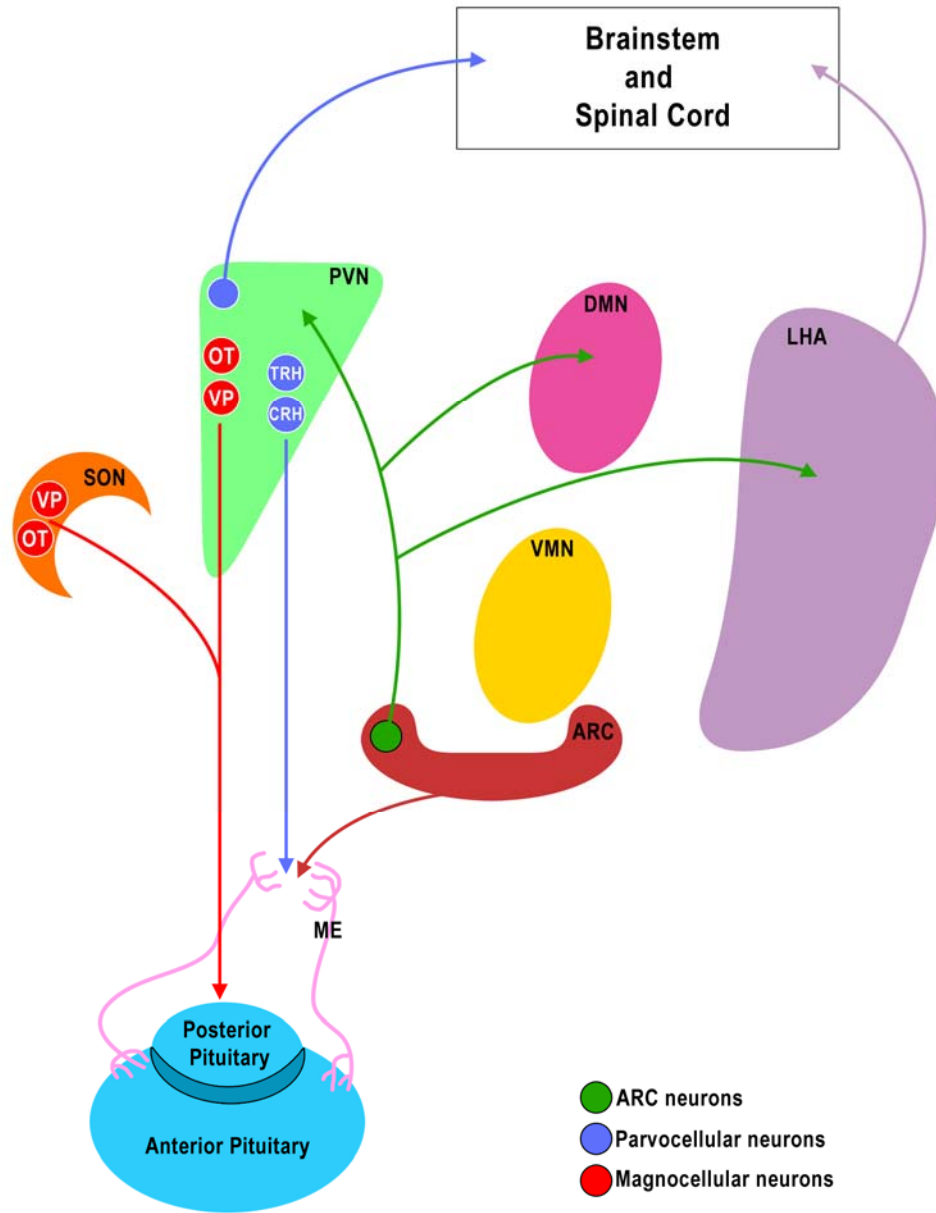


Figure 1.

Figure 1. Structural and functional relationship between hypothalamic nuclei. The paraventricular (PVN) and supraoptic nuclei contain magnocellular neurons (in red), producing either OT or AVP, that project to the posterior pituitary. The PVN also contains parvocellular neurons (in blue) that project to the medial eminence (ME) where they secrete a number of factors, including TRH and CRH, that are taken up by the small vasculature of the ME and transported to the anterior pituitary. These factors modulate secretion of anterior pituitary hormones. A second population of parvocellular neurons project to preganglionic neurons of the autonomic nervous system. The ARC, which is located just dorsal to the ME, projects axons to the PVN, the dorsal median nucleus (DMN) and the lateral hypothalamic area (LHA), whereas the ventromedial nucleus (VMN) projects to several intra- and extrahypothalamic sites. The adiposity signal leptin reduces food intake at least in part by acting in the ARC. ARC neurons expressing *Npy/Agrp* and *Cart/Msh* project to the PVN (Elmquist, J. K. et al. 1999; Elias, C. F. et al. 1999). Electrophysiological studies have shown that individual neurons within the PVN are capable of detection and integration of the NPY and MSH signals (Cowley, M. A. et al. 1999). Leptin decreases the expression of *Npy* and *Agrp* transcripts in median cells and increases the expression of *Cart* and *Msh* transcripts in lateral cells of the ARC (Elmquist, J. K. et al. 1999). Genetic and physiological studies indicate that both NPY and AgRP increase food intake and decrease energy expenditure (Billington, C. J. et al. 1991; Graham, M. et al. 1997; Ollmann, M. M. et al. 1997), whereas CART and MSH, which is derived from POMC, have the opposite effects (Fan, W. et al. 1997; Kristensen, P. et al. 1998). These changes of expression are expected to generate a similar physiological response as that of leptin – decrease of food intake and increase of energy expenditure.

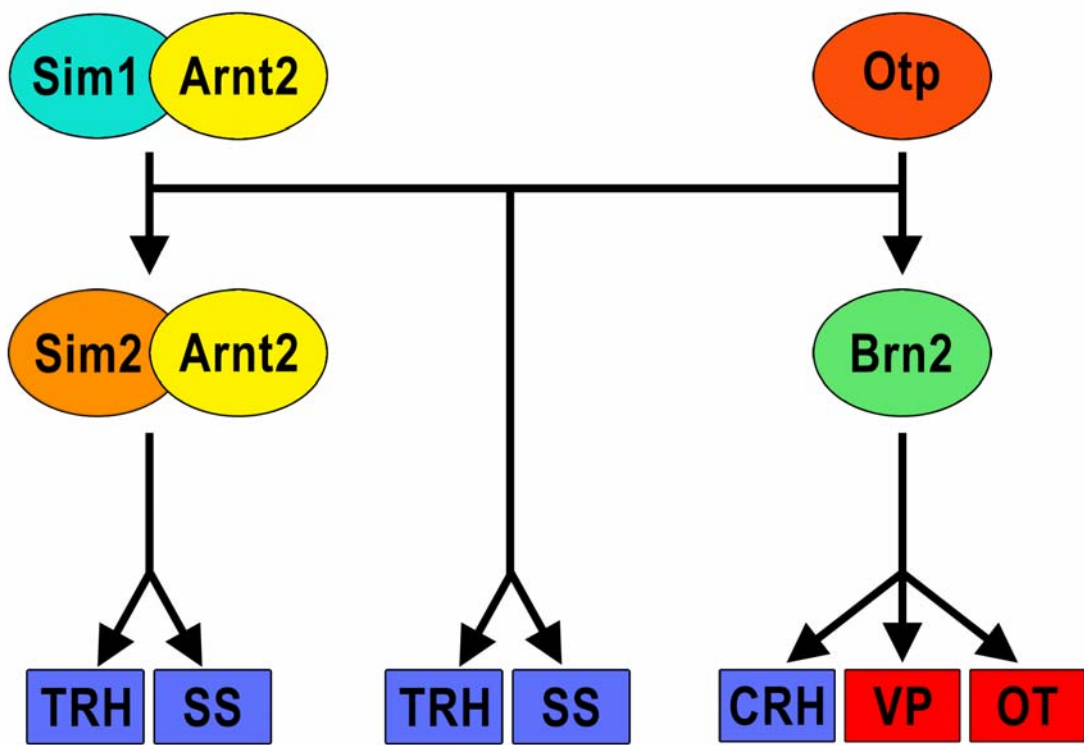


Figure 2.

Figure 2. Transcriptional regulation of anterior hypothalamic development. SIM1:ARNT2 and OTP function in parallel to control the development of virtually all neurons of the PVN/SON, of TRH producing neurons of the preoptic region and of SS-producing neurons of the anterior periventricular nucleus, which is located ventrally contiguous to the PVN. These two complexes are required to maintain *Brn2* expression, which, in turn, directs the development of CRH-, OT- and AVP-producing neurons of the PVN and SON. SIM1:ARNT2 and OTP also act upstream of SIM2 for the development of subsets of TRH cells located in the PVN and preoptic region and of SS cells found in the anterior periventricular nucleus.

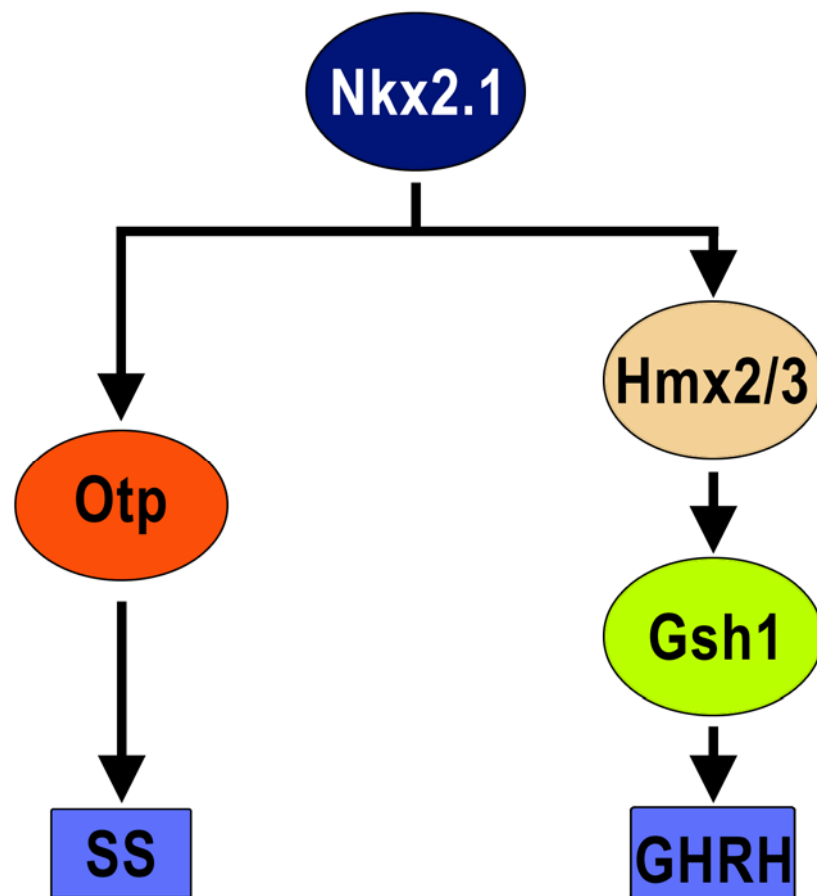


Figure 3.

Figure 3. Transcriptional regulation of arcuate nucleus development. *Nkx2.1* functions early during development to specify the ventral anlage of the caudal hypothalamus, which includes the ARC. *Hmx2* and *Hmx3* together act upstream of *Gsh1* for the expression of *GhRH*, whereas *Otp* is required for *Ss* expression in the ARC.