

Université de Montréal

**Régulation transcriptionnelle du développement de
l'hypothalamus chez l'amphibien**

Par
Khalil Bouyakdan

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.sc)
en biochimie

Août, 2010

© Khalil Bouyakdan

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Régulation transcriptionnelle du développement de l'hypothalamus chez l'amphibien

Présenté par :
Khalil Bouyakdan

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Muriel Aubry, président-rapporteur
Dr. Jacques Michaud, directeur de recherche
Dr. Stéphane Roy, membre du jury

Résumé

Le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus régule une série de phénomènes physiologiques incluant l'équilibre énergétique et la pression artérielle. Nous avons identifié une cascade de facteurs de transcription qui contrôle le développement du PVN. SIM1 et OTP agissent en parallèle pour contrôler la différenciation d'au moins cinq types de neurones identifiables par la production d'OT, AVP, CRH, SS et TRH. Ces Facteurs de transcriptions contrôlent le développement des lignées CRH, AVP et OT en maintenant l'expression de Brn2 qui à son tour est nécessaire pour la différenciation terminale de ces neurones. L'analyse du transcriptome du PVN nous a permis d'identifier plusieurs gènes qui ont le potentiel de contrôler le développement du PVN. Nous voulons développer un paradigme de perte de fonction qui permettrait l'étude de ces gènes candidats sur une grande échelle. Le but de ce projet est de caractériser le PVN en développement de l'amphibien en vue de l'utilisation de ce modèle pour des études fonctionnelles.

Nous avons cloné des fragments de cDNA de Sim1, OTP, Brn2, Sim2, CRH, Ot, AVP et TRH à partir de l'ARN total de *Xenopus Laevis*. Nous avons adapté notre technique d'hybridation *in situ* pour caractériser l'expression de ces gènes chez l'amphibien aux stades 33-39, 44, 51, 54, 60, et chez l'adulte. Résultats. Les Facteurs de transcription Sim1, OTP, et Brn2 commencent à être exprimés dans le PVN prospectif au stade 33. L'expression des marqueurs de différenciation terminale devient détectable entre les stades 37 et 39. De façon intéressante, le PVN occupe initialement un domaine de forme globulaire puis à partir du stade 44 s'allonge le long

de l'axe dorso-ventral. Cet allongement se traduit par une organisation en colonnes des cellules du PVN que nous n'avons pas observée chez les rongeurs.

Le développement du PVN est conservé chez l'amphibien dans la mesure où la relation entre l'expression des facteurs de transcription et des marqueurs de différenciation terminale est conservée. Il existe par ailleurs des différences entre la topographie des PVN des mammifères et de l'amphibien. L'organisation en colonnes de cellules pourrait correspondre à des mouvements de migration tangentielle. Nous sommes maintenant en mesure de tester la fonction des facteurs de transcription dans le PVN par l'approche d'inactivation par morpholinos.

Mots clés : *Xenopus laevis*, hypothalamus, noyau paraventriculaire, morpholino, facteurs de transcription, différenciation terminale, Trh, Crh, Avp, Sim1, Otp, Brn2.

Abstract

The paraventricular nucleus PVN of the hypothalamus regulates a series of physiological phenomena including the maintenance of energetic balance and arterial blood pressure. We have previously identified a cascade of transcription factors that control the development of the PVN. Sim1 and OTP act in concert to mediate the terminal differentiation of at least five types of neurons identifiable by their production of OT, AVP, CRH, SS and TRH. These transcription factors control the development of the OT, AVP and CRH producing neurons by maintaining the expression of Brn2, which is in turn required for the terminal differentiation of these cell lines. The transcriptome analysis of the PVN allowed us to identify a handful of genes that are potentially implicated in the development of this brain structure. Our goal is to develop a loss of function paradigm that would allow a high throughput study of these candidate genes. The main goal of this project is to characterize the developing PVN in the amphibian in order to use this model in our functional studies of these genes.

We have cloned fragments of cDNA of Sim1, OTP, Brn2, Sim2, CRH, TRH, AVP and OT using *Xenopus laevis* total RNA. We have also adapted our in situ hybridization technique to characterize the expression of these genes in stage 33-39, 44, 51, 54, 60 and adult amphibian brain.

Sim1, OTP and Brn2 are expressed in the prospective PVN as soon as stage 33. The expression of the terminal differentiation markers become detectable between stages 37-39. Interestingly, the PVN is initially restricted to a more globular domain

and begins to extend along the dorso-ventral axis at around stage 44. This vertical extension translates into a column organization that we do not observe in rodents.

The development of the PVN is well conserved in the amphibian in the sense that the relation between the expression of the different transcription factors and the terminal differentiation markers is conserved. We can also observe some topographical differences between the mammalian and amphibian PVN. The column organization the different PVN cell types might correspond to the tangential migration that is observed in the mouse. We are now well equipped to test the function in the PVN of the known transcription factors as well as the candidate genes previously identified in our lab using a morpholino-mediated gene knock down.

Keywords : *Xenopus laevis*, hypothalamus, paraventricular nucleus, morpholino, transcription factors, terminal differentiation, Trh, Crh, Avp, Sim1, Otp, Brn2.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
Liste des tableaux.....	X
Liste des figures.....	X
Liste des abréviations	XII
REMERCIEMENTS	XIII
CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	1
SECTION I : ANATOMIE/PHYSIOLOGIE	1
1 Hypothalamus.....	1
1.1 Généralités	1
2 Noyaux	1
2.1 Noyau paraventriculaire	3
2.1.1 Afférences	3
2.1.2 Projections.....	3
2.2 Noyau arqué.....	5
2.3 Noyau supraoptique	7
2.4 Aire latérale de l'hypothalamus	8
3 Les neuropeptides.....	9
3.1 Ocytocine.....	9
3.2 Vasopressine.....	11
3.3 Hormone de relâche de la thyrotropine	12
3.4 Hormone de relâche de la corticotropine	14
3.5 Somatostatine	16
4 Amphibien.....	18
4.1 Généralités	18

4.2 <i>Métamorphose</i>	19
4.2.1 <i>Contrôle hormonal</i>	20
4.2.2 <i>Hypothalamus</i>	23
SECTION 2 : DÉVELOPPEMENT.....	25
5 Développement de l'Hypothalamus.....	25
5.1 <i>Modèle du développement medio-latéral de l'hypothalamus</i>	25
5.2 <i>Modèle des deux couches</i>	28
6 Développement du Noyau Paraventriculaire de l'Hypothalamus.....	29
6.1 <i>Cascade des facteurs de transcription</i>	31
6.1.1 <i>Sim1 et Arnt2</i>	32
6.1.2 <i>Sim2</i>	35
6.1.3 <i>Otp</i>	35
6.1.4 <i>Brn2</i>	37
7 Hypothèses et objectifs.....	38
CHAPITRE II : DEVELOPMENT OF THE ANTERIOR HYPOTHALAMUS IN THE AMPHIBIAN.....	40
ABSTRACT.....	42
INTRODUCTION.....	43
MATERIALS AND METHODS.....	45
Animals.....	45
Tissue preparation.....	45
Cloning of <i>Xenopus</i> in Situ probes.....	46
Immunofluorescence.....	46
<i>In Situ</i> hybridization.....	47
RESULTS AND DISCUSSION.....	48
ACKNOWLEDGEMENTS.....	51
REFERENCES.....	52
CHAPITRE III : DISCUSSION.....	63
Conservation entre les modèles.....	63

Développement de l'hypothalamus durant la métamorphose	67
L'utilisation des morpholinos.....	68
Avantages du modèle	70
Conclusion.....	72
BIBLIOGRAPHIE	74
CHAPITRE IV: ANNEXE I: ALIGNEMENT DE SEQUENCES DES SONDES <i>IN SITU</i>	85

Liste des Tableaux

Table 1. List of the probes used in this study	54
--	----

Liste des Figures

Figure I-1. Différents noyaux de l'hypothalamus antérieur	02
Figure I-2. Le PVN, ses types cellulaires et ses projections axonales	05
Figure I-3. Circuit neuronal de la régulation de la prise alimentaire	07
Figure I-4. Positionnement de l'aire latérale de l'hypothalamus	09
Figure I-5. Clivage de la pro-opiomélanocortine	15
Figure I-6. Les différentes phases de la métamorphose	20
Figure I-7. Déiodination de l'hormone thyroïdienne	21
Figure I-8. Différents mécanismes de migration radiale et tangentielle	27
Figure I-9. Modèle du développement médio-latéral de l'hypothalamus	30
Figure I-10. Cascade de facteurs de transcription régulant la différenciation des cinq types cellulaires majeurs qui peuplent le PVN	32
Figure II-1. First signs of terminal differentiation	54
Figure II-2. Elongation of the expression domains	55
Figure II-3. Onset of <i>Crh</i> expression	56
Figure II-4. Terminal differentiation at the onset of prometamorphosis	57
Figure II-5. Terminal differentiation at the climax of metamorphosis	59
Figure II-6. Terminal differentiation in the adult brain	61
Figure II-7. Transcription factors of the PVN in the adult brain	62

Figure III-1. Neurog�nese et différentiation terminale des neurones du PVN amphibien	65
Figure III-2. �talement des domaines d'expression des neuropeptides	66
Figure IV-1. Alignement de la sonde Otp.	85
Figure IV-2. Alignement de la sonde Sim1.	86
Figure IV-3. Alignement de la sonde Sim2.	88
Figure IV-4. Alignement de la sonde Brn2.	89
Figure IV-5. Alignement de la sonde Trh.	90
Figure IV-6. Alignement de la sonde Avp.	91
Figure IV-7. Alignement de la sonde Crh.	91

Liste des abréviations

ACTH	Adrénocorticotrophine
ALH	Aire Latérale de l'Hypothalamus
ARC	Noyau Arqué
Arnt2	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
AVP	Vasopressine
BrdU	5-bromo-2'-déoxyuridine
Brn2	Brain 2
CRH	Hormone de Relâche de la Corticotrophine
DMV	Noyau moteur dorsal du nerf vagal
DVC	Complexe Vagal Dorsal
HT	Hormone Thyroïdienne
MCN	Neurones Magnocellulaires
NST	Noyau du Tract Solitaire
OT	Ocytocine
OTP	Orthopedia
PCN	Neurones Parvocellulaires
POMC	Pro-opiomélanocortine
PVN	Noyau Paraventriculaire
Sim1/2	Single minded 1/2
SNC	Système nerveux central
SON	Noyau Supra-optique
SS	Somatostatine
TR α ou β	Récepteur de l'hormone thyroïdienne α ou β
TRH	Hormone de Relâche de la Thyrotropine
TSH	Thyrotropine

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. Jacques Michaud, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir accueilli dans votre laboratoire, j'ai beaucoup appris grâce à vous et je vous en suis très reconnaissant. J'aimerais aussi remercier Aurore, tu m'as beaucoup appris durant ma maîtrise et je ne serais sûrement pas là où j'en suis sans tes précieux conseils. Francine, merci de m'avoir poussé dans le dos à quelques reprises, vous allez me manquer toutes les deux.

Je veux aussi remercier les membres les plus récents du laboratoire Michaud, Lysanne, Derek, Martin, Mario et Abdullah, chacun d'entre vous a contribué à sa manière à ma formation et je vous en remercie. L'ambiance est bien plus enjouée depuis votre arrivée au laboratoire.

Merci à mes parents, mon père, ma mère et mon frère qui ont tous cru en moi et m'ont beaucoup encouragé et supporté durant ma maîtrise. Merci de m'avoir enduré pendant ma rédaction. Grâce à vous tous, je garderais de très bons souvenirs de ma maîtrise.

Chapitre I : Introduction

Section 1 : Anatomie/Physiologie

1 Hypothalamus

1.1 Généralités

L'hypothalamus est une région du cerveau qui est présente chez tous les vertébrés. Cette structure intègre des signaux en provenance d'autres régions du cerveau, et de la périphérie pour maintenir l'homéostasie en contrôlant, entre autres, l'équilibre énergétique, la pression sanguine, la réponse au stress ainsi que plusieurs aspects de la reproduction (Swanson and Sawchenko, 1983; Saper, 2002; Caqueret, Yang et al., 2005; Morton, Cummings et al., 2006).

2 Noyaux

L'hypothalamus peut être divisé en trois régions principales le long de l'axe médio-latéral, soit la région périventriculaire, médiale et latérale et est composé d'une douzaine de petits noyaux, dont le PVN, le noyau supra-optique (SON), l'aire latérale de l'hypothalamus (ALH) et le noyau arqué (ARC) (Figure I-1). Plusieurs études ont permis d'associer une panoplie de fonctions à ces différents noyaux de

l'hypothalamus. De plus, ces noyaux semblent former des connexions avec d'autres régions du cerveau et de l'hypothalamus.

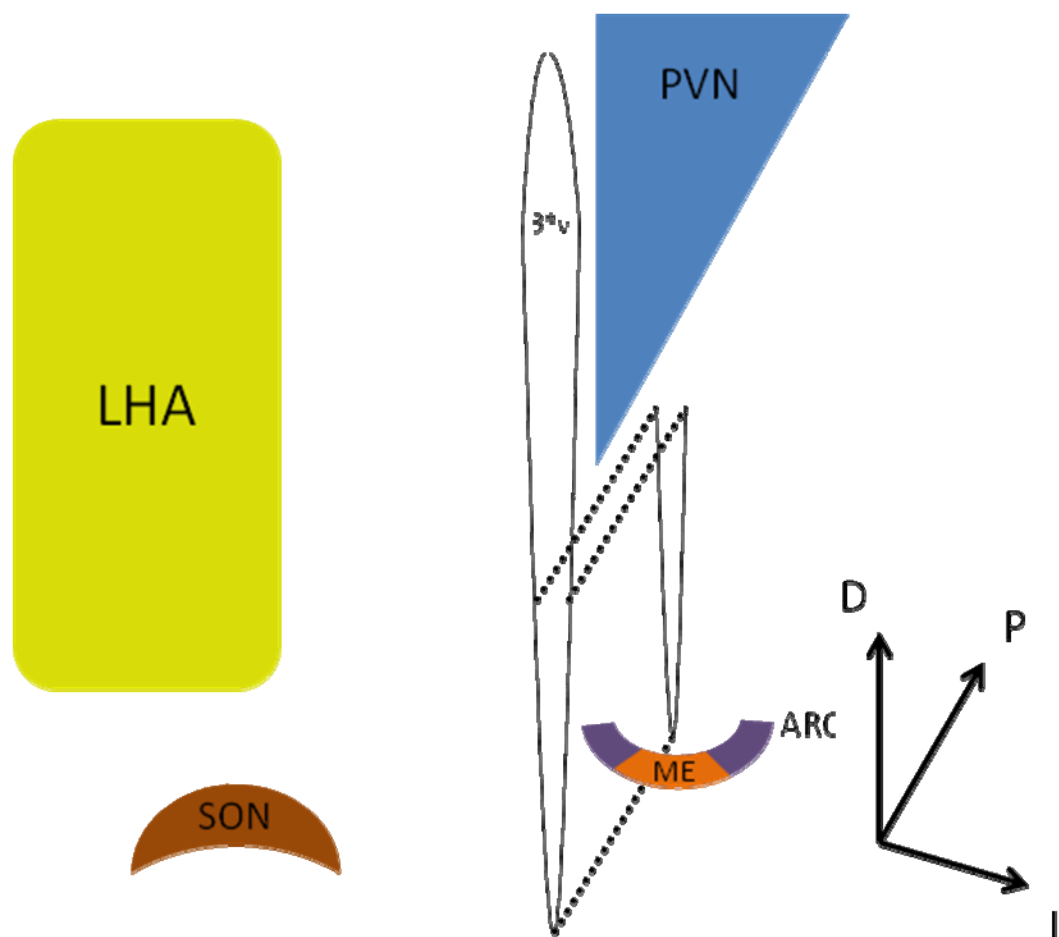


Figure I-1. Différents noyaux de l'hypothalamus antérieur. L'hypothalamus antérieur est composé de plusieurs noyaux séparés par des régions moins bien définies, figurent ici quatre noyaux disposés autour du troisième ventricule. PVN : noyau paraventriculaire, LHA : aire latérale de l'hypothalamus, SON : noyau supraoptique, ARC : noyau arqué, ME : éminence médiane, 3°v : troisième ventricule, D : dorsal, P : postérieur, L : latéral.

2.1 Noyau paraventriculaire

Le PVN borde le troisième ventricule. Cette structure de l'hypothalamus antérieur est impliquée dans l'équilibre énergétique, le contrôle de la prise alimentaire et la régulation de la pression artérielle (Michaud, Boucher et al., 2001; Chen and Pan, 2006).

2.1.1 Afférences

Pour exercer son rôle de régulation, le PVN intègre plusieurs signaux provenant de divers noyaux et régions du système nerveux central (SNC). Le PVN reçoit des projections provenant de l'ARC qui participent à un circuit régulant le métabolisme énergétique et la prise alimentaire en réponse à la leptine (Pickavance, Dryden et al., 1996; Legradi and Lechan, 1999). Des projections venant d'un autre noyau hypothalamique, le SCN, innervent aussi le PVN (Watts, Swanson et al., 1987; Kalsbeek, La Fleur et al., 2004). Le PVN reçoit aussi des projections venant de l'hippocampe, ces neurones ont un effet inhibiteur sur l'expression de l'hormone de relâche de la corticotropine (CRH), des récepteurs des minéralocorticoïdes et du récepteur des glucocorticoïdes (Han, Ozawa et al., 2007). Des évidences lient aussi les neurones noradrénergiques du tronc cérébral ainsi que le cervelet au PVN (Cunningham and Sawchenko, 1988; Wen, Zhu et al., 2004).

2.1.2 Projections

Le PVN comprend principalement trois types de neurones. Les neurones magnocellulaires (MCN) projettent leur axone à l'hypophyse postérieure où ils

sécrètent soit l'ocytocine (OT) ou la vasopressine (AVP) dans la circulation générale. Le noyau supra-optique, qui est formé par la migration latérale d'un contingent de neurones à partir du PVN prospectif, est principalement composé de MCN. Les neurones parvocellulaires (PCN) hypophysiotrophiques du PVN projettent leurs axones vers l'éminence médiane où ils relâchent la somatostatine (SS), l'hormone de relâche de la thyrotropine (TRH) et la CRH. Ces peptides sont acheminés par un réseau vasculaire à l'hypophyse antérieure où ils contrôlent la sécrétion de plusieurs hormones dans la circulation générale. Finalement, certains PCN projettent leurs axones vers des sites extra hypothalamiques comme le tronc cérébral et la moelle épinière, formant entre autres des synapses avec les neurones pré-ganglionnaires du système nerveux autonome (Figure I-2) (Ranson, Motawei et al., 1998).

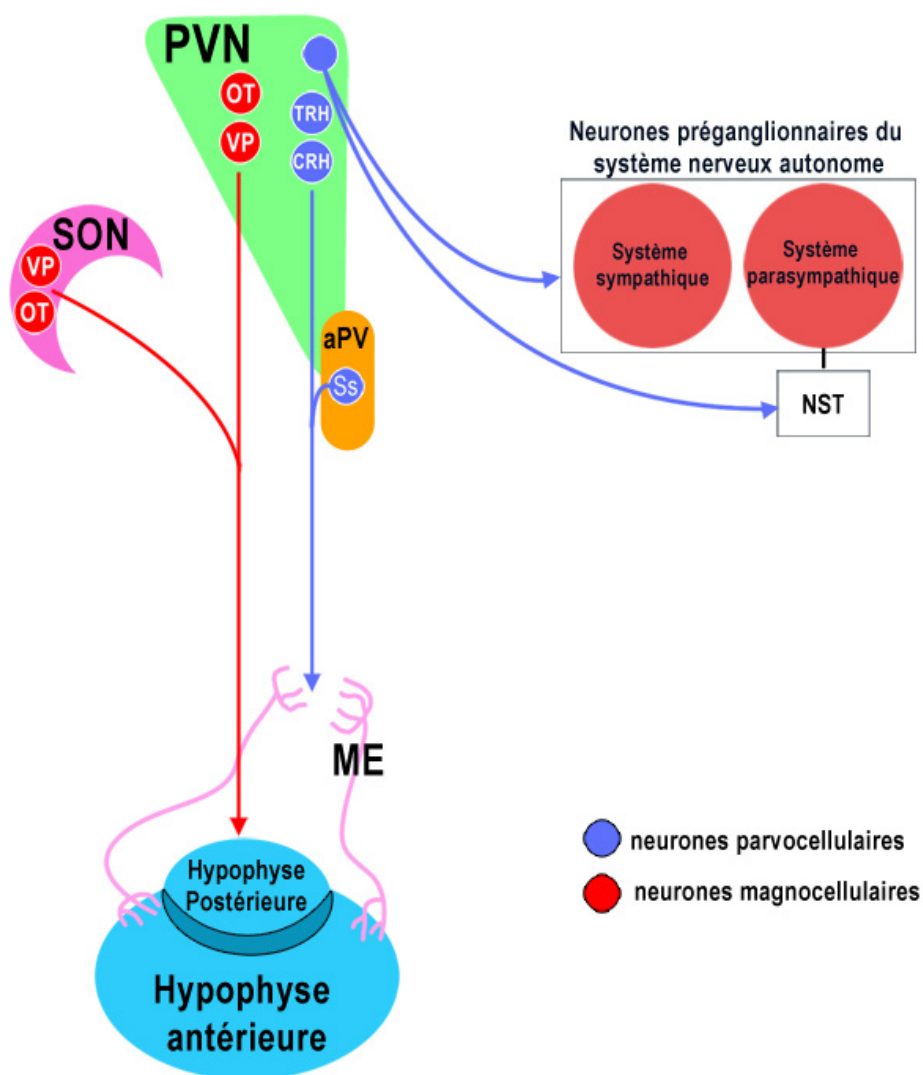


Figure I-2. Le PVN, ses types cellulaires et ses projections axonales. Le PVN est composé de deux populations neuronales majeures, les neurones magnocellulaires et parvocellulaires, qui projettent leurs axones à l'hypophyse et au système nerveux autonome (SNA). SON : noyau supraoptique, aPV : noyau périventriculaire antérieur.

2.2 Noyau arqué

Le noyau arqué est un noyau situé à la base du troisième ventricule de l'hypothalamus. La barrière hémato-encéphalique qui recouvre l'ARC possède des

propriétés particulières, permettant le passage ou le transport de certains effecteurs du métabolisme périphérique. Par exemple, ce noyau perçoit des changements dans la concentration de la leptine, une hormone peptidique synthétisée par les adipocytes, ces signaux sont alors relayés au PVN par des neurones exprimant le neuropeptide-Y pour y réguler la prise alimentaire (Figure I-3) (Jhanwar-Uniyal, Beck et al., 1993). La leptine a une action activatrice sur les neurones exprimant pro-opiomélanocortine (POMC), produisant la MSH, un neurotransmetteur agissant le long d'une voie de la satiété. Les neurones exprimant le neuropeptide-Y, qui ont un effet orexigène, sont inhibés par ce même peptide (Perello, Stuart et al., 2007; Kohno, Suyama et al., 2008). La leptine est aussi capable d'augmenter les niveaux de thermogénèse en augmentant l'activité neuronale sympathique dans les tissus adipeux bruns. En effet, des études sur l'ARC démontrent qu'une activation de ce noyau par des injections de leptine contribue à augmenter l'activité neuronale sympathique dans les tissus adipeux bruns ainsi que dans les reins. Ces mêmes injections augmentent aussi la pression artérielle dans ces tissus (Rahmouni and Morgan, 2007).

L'ARC, par l'intermédiaire de ses neurones sécrétant la Kisspeptine, est impliqué dans la régulation des fonctions reproductrices. Ces neurones seraient essentiels à la sécrétion oscillatoire de l'hormone lutéinisante par l'entremise de la gonadotrophine (Li, Kinsey-Jones et al., 2009).

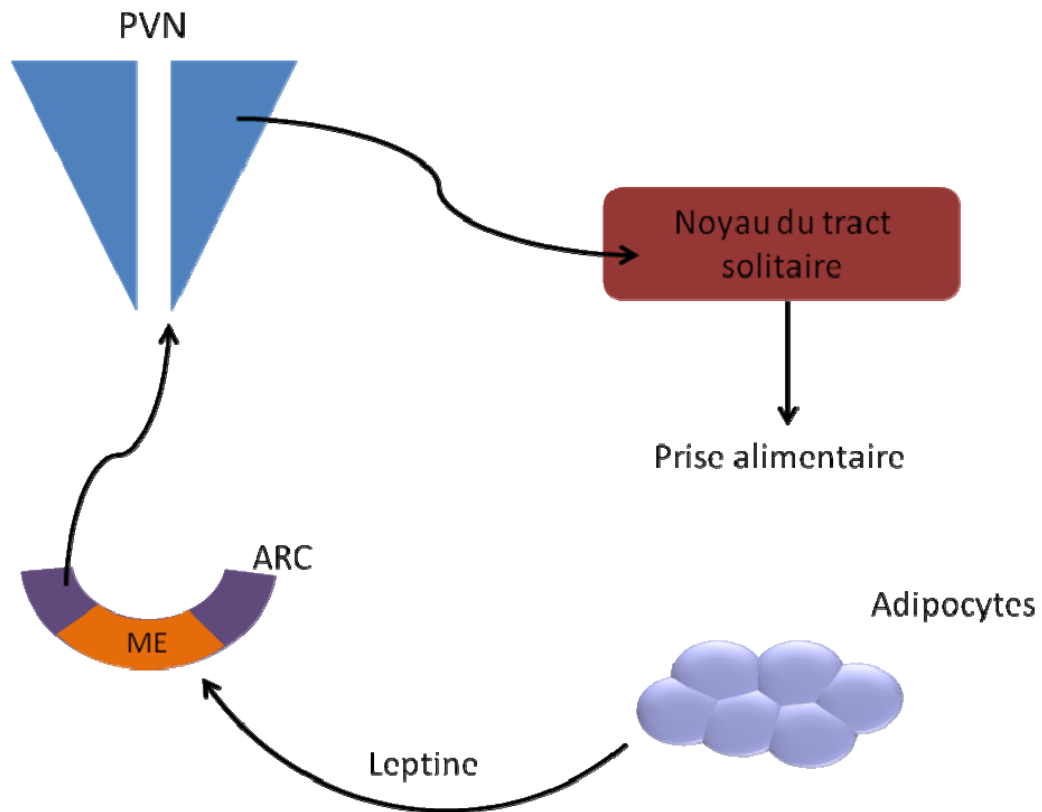


Figure I-3. Circuit neuronal de la régulation de la prise alimentaire. Les adipocytes sécrètent la leptine en réponse à une prise alimentaire, ces changements sont détectés dans l'ARC et relayés au PVN. Le PVN achemine ces signaux via ses projections axonales vers le noyau du tract solitaire (NST) pour réguler la prise alimentaire. PVN : noyau paraventriculaire, ARC : noyau arqué, ME : éminence médiane.

2.3 Noyau supraoptique

Le SON est situé à la base du cerveau en position adjacente au chiasma optique. C'est un noyau composé presque entièrement de neurones magnocellulaires produisant l'OT ou l'AVP. Ces neurones proviennent de la migration d'une partie des MCN du noyau paraventriculaire (Xu and Fan, 2007). Ces neurones projettent

majoritairement leurs axones vers l'hypophyse postérieure, mais une fraction d'entre eux projettent à des sites dans le SNC (Inyushkin, Orleans et al., 2009). La sécrétion de l'OT et de l'AVP dans l'hypophyse postérieure est assujettie aux mêmes mécanismes de régulation que ceux décrits pour le PVN.

2.4 Aire latérale de l'hypothalamus

L'aire latérale de l'hypothalamus est une région de l'hypothalamus qui s'étend médialement du fornix à la limite latérale de l'hypothalamus. L'aire latérale de l'hypothalamus englobe le noyau tubéromamillaire, le noyau tubéral latéral et les faisceaux médiaux du télencéphale (Figure I-4). L'ALH est associé à la régulation de l'équilibre énergétique. L'ALH reçoit des projections de neurones sensibles à la leptine provenant de l'ARC. Ces neurones peuvent être activés ou inhibés par la leptine. (Elias, Aschkenasi et al., 1999). Il a aussi été démontré que les niveaux d'orexine, un peptide impliqué dans la régulation de la prise alimentaire, sont augmentés dans l'ALH en réponse à une hypoglycémie (Griffond, Risold et al., 1999). L'ALH pourrait aussi être impliqué dans le contrôle de la soif par des mécanismes indépendants de ceux en jeu pour la prise alimentaire (Yao, Gouraud et al., 2005). Cette région de l'hypothalamus régulerait aussi certaines fonctions sexuelles comme l'excitation sexuelle, l'érection et l'intervalle post-éjaculatoire (Lorrain, Matuszewich et al., 1997; Kippin, Sotiropoulos et al., 2004).

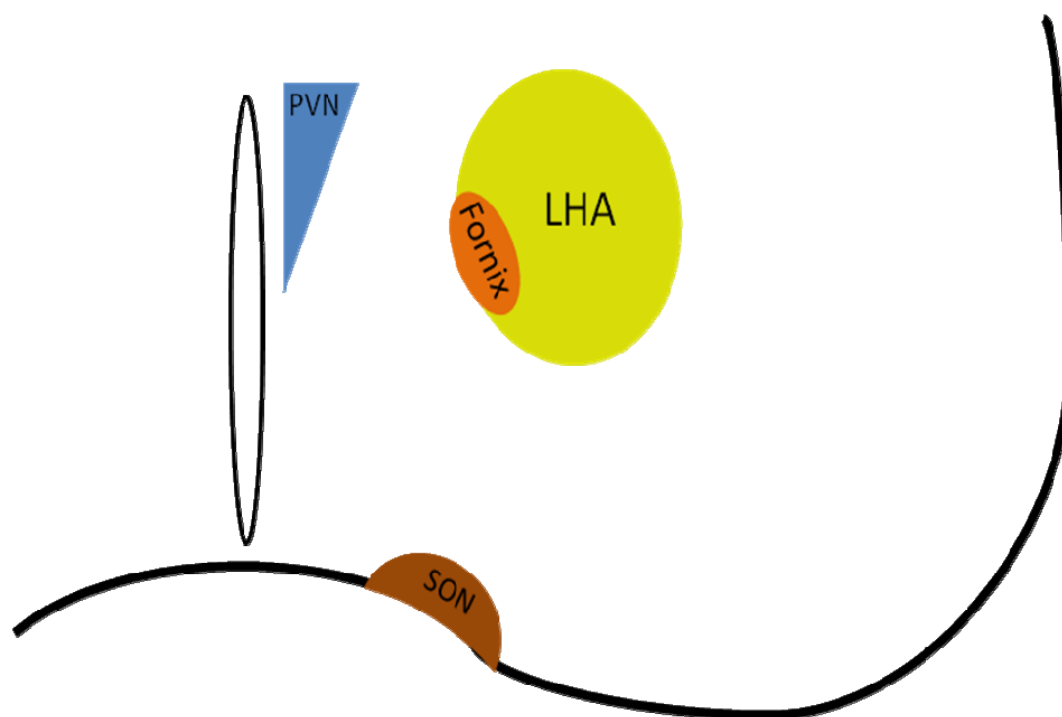


Figure I-4. Positionnement de l'aire latérale de l'hypothalamus. L'emplacement de l'ALH au sein de l'hypothalamus antérieur par rapport au PVN, SON et au fornix. PVN : noyau paraventriculaire, LHA : aire latérale de l'hypothalamus, SON : noyau supraoptique.

3 Les neuropeptides

3.1 Ocytocine

L'OT joue un rôle dans plusieurs fonctions biologiques importantes comme la parturition en provoquant ou en accélérant les contractions utérines (Russell, Leng et al., 2003) et dans l'éjection du lait, stimulée par la succion du nourrisson lors de la lactation (Young, Shepard et al., 1996). L'OT est aussi synthétisée dans certains

neurones parvocellulaires du PVN. Ces PCN projettent leurs axones vers différents sites intra et extra hypothalamiques du cerveau et de la moelle épinière. L'ocytocine produite par ces neurones agit en tant que neurotransmetteur plutôt qu'en tant qu'hormone endocrine. Des observations suggèrent que les PCN produisant l'ocytocine peuvent être stimulés par le noyau arqué en réponse à la leptine. Ces neurones pourraient inhiber la prise alimentaire via leurs projections au noyau de la voie solitaire et au noyau dorsal moteur du nerf vague, situés dans le tronc cérébral (Blevins, Schwartz et al., 2004). En effet, plusieurs études lient la déficience, ou une mauvaise régulation de l'ocytocine, à l'obésité, qu'elle mette en jeu ou non une hyperphagie (Kublaoui, Gemelli et al., 2008; Camerino, 2009).

Les neurones ocytocinergiques du PVN sont possiblement impliqués dans la régulation de la nociception, ou la perception de la douleur. Certaines études ont démontré l'existence d'un circuit neuronal liant les PCN ocytocinergiques aux cornes dorsales de la moelle épinière, centre souvent associé à la douleur (Condes-Lara, Rojas-Piloni et al., 2009). Ces mêmes neurones sont impliqués dans l'inhibition de la potentialisation à long terme des neurones nociceptif de la moelle épinière, un mécanisme qui serait associé à la douleur chronique. Une stimulation électrique du PVN ou une injection intrathécale d'ocytocine a empêché de façon transitoire la potentialisation à long terme menant à une hyperactivation des neurones des cornes dorsales (DeLaTorre, Rojas-Piloni et al., 2009).

Une autre fonction de l'ocytocine en tant que neurotransmetteur est le contrôle du comportement maternel et de l'attachement. C'est en agissant sur l'aire tégmentale ventrale, qui à son tour va réguler à la hausse les niveaux de dopamine dans le noyau

accumbens, que l'OT exerce son contrôle sur l'attachement maternel. Des rates ayant un meilleur comportement maternel, caractérisé par plus de toilettage des ratons, ont des niveaux d'ocytocine plus élevés dans le noyau paraventriculaire ainsi que plus de projections de neurones positifs pour l'OT vers l'aire tégmentale ventrale (Shahrokh, Zhang et al., 2010).

L'ocytocine est aussi fortement associée aux fonctions sexuelles des mammifères, que ce soit en tant que neurotransmetteur à des sites extra hypothalamiques du cerveau et de la moelle épinière, ou en tant qu'hormone circulante. (Argiolas and Melis, 2004; Pfaus, 2009).

3.2 Vasopressine

La vasopressine, aussi connue comme l'hormone antidiurétique, est une hormone peptidique produite dans le PVN. Tout comme l'OT, elle est majoritairement produite dans les MCN du SON et du PVN pour être ensuite acheminée et emmagasinée dans l'hypophyse postérieure. Ce peptide est aussi présent dans certains neurones parvocellulaires du PVN. L'AVP agit à plusieurs niveaux dans les reins pour accroître la perméabilité à l'eau des tubes collecteurs en augmentant la quantité d'aquaporines exprimées à la membrane des cellules épithéliales de ces tubes (Nielsen, Chou et al., 1995). Tout comme son nom semble l'indiquer, la vasopressine a aussi un effet vasoconstricteur et contribue à maintenir une bonne pression artérielle dans les cas d'hypovolémie et d'hypotension (Holmes, Landry et al., 2004).

L'AVP n'a pas uniquement une action périphérique. Elle est aussi relâchée à plusieurs sites intra et extra hypothalamiques pour moduler, entre autres, plusieurs comportements sociaux. Plusieurs observations lient l'AVP aux comportements agresseurs de certains rongeurs monogames après accouplement. Ces rongeurs démontrent une activité accrue des neurones vasopressinergiques du PVN et d'autres régions du cerveau (Gobrogge, Liu et al., 2007). Cette même hormone joue aussi un rôle important dans l'attachement. Certaines études démontrent que l'attachement est facilité par des injections d'AVP intracérébroventriculaires et inhibé par un antagoniste du récepteur AVPR1a (Winslow, Hastings et al., 1993).

D'autres fonctions peuvent être associées à l'AVP comme la reconnaissance sociale. Des souris dont le récepteur *Avpr1a* a été inactivé présentent des défauts de reconnaissance sociale sans toutefois présenter des troubles olfactifs (Bielsky, Hu et al., 2005). L'AVP pourrait aussi être impliqué dans certains processus cognitifs comme la mémoire, des rats naturellement haploinsuffisants en *Avp* ont des déficits de mémoire spatiale (Aarde and Jentsch, 2006). On observe le même phénotype chez des souris dont le récepteur AVPR1a est inactivé (Egashira, Tanoue et al., 2004).

3.3 Hormone de relâche de la thyrotropine

La TRH stimule la production et la relâche de la thyrotropine (TSH) par les cellules de l'hypophyse (Harris, Christianson et al., 1978). La TSH agit sur la glande thyroïde en stimulant la libération de l'hormone thyroïdienne (HT). La TRH joue donc un rôle important dans le maintien et la régulation du métabolisme de base via son action sur le système thyroïdien. Des restrictions alimentaires entraînent une

diminution des niveaux de T_4 et T_3 , soit l'HT et son métabolite actif. Cette diminution est accompagnée par une baisse du métabolisme basal et des niveaux de TRH hypothalamique. Une injection d'une faible dose de leptine restaure les niveaux normaux de T_4 et T_3 , ainsi que le métabolisme basal, à des niveaux normaux (Guo, Bakal et al., 2004; Fekete, Singru et al., 2006). Ces données sont supportées par le fait que les neurones à TRH du PVN sont innervés par certains neurones du noyau arqué, un noyau majeur dans la détection des niveaux circulant de leptine (Legradi and Lechan, 1998; Legradi and Lechan, 1999). Ces données suggèrent un mécanisme de conservation de l'énergie en réponse à une faible disponibilité de nourriture.

Toujours par son action sur l'hormone thyroïdienne, la TRH participe activement à la régulation de la température corporelle, ou l'homéothermie. La TRH agit par plusieurs voies pour activer différents processus thermogéniques. L'HT active les processus de thermogénie obligatoire en stimulant la consommation d'ATP et en réduisant l'efficacité énergétique de sa synthèse. L'HT agit aussi sur des processus facultatifs de génération de la chaleur comme le découplage de la phosphorylation oxydative dans les tissus adipeux bruns (Silva, 2006).

La TRH n'est pas exclusivement une hormone, elle agit aussi comme neurotransmetteur dans plusieurs régions du SNC. La TRH est impliquée dans les processus d'excitation et contribue à promouvoir l'état d'éveil par l'activation des neurones histaminergiques du noyau tubéromamillaire (Parmentier, Kolbaev et al., 2009) et des processus cognitifs comme la mémoire (Aguilar-Valles, Sanchez et al., 2007). Elle peut jouer un rôle dans certains désordres comme la dépression et

l'anxiété, comme démontré par des souris déficientes en récepteur de la TRH type 2 (Sun, Zupan et al., 2009).

Des études, tant chez la souris que chez l'humain, suggèrent une implication de la TRH dans les neurones moteurs de la moelle épinière. Un analogue de la TRH peut prévenir contre la dégénération des neurones moteurs de la moelle épinière chez des souris Wobbler, un modèle animal pour la sclérose latérale amyotrophique ou ALS et l'amyotrophie spinale (Ikeda, Iwasaki et al., 1998). Chez l'humain, l'administration de TRH améliore la force musculaire de patients atteints d'amyotrophie spinale (Tzeng, Cheng et al., 2000).

3.4 Hormone de relâche de la corticotropine

La CRH est une importante hormone de réponse de stress. Dans l'hypophyse antérieure, la CRH stimule la synthèse et la sécrétion de la pro-opiomélanocortine (POMC) dans les cellules de l'hypophyse. Ce peptide est clivé par des endopeptidases pour produire plusieurs hormones comme l'adrénocorticotrophine (ACTH), la β -endorphine et plusieurs autres (Figure I-5). L'ACTH stimule la production des glucocorticoïdes et des minéralocorticoïdes dans les glandes surrénales (Owens and Nemeroff, 1991). Ce sont ces molécules qui sont responsable de l'effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur de la CRH (Chrousos, 1995).

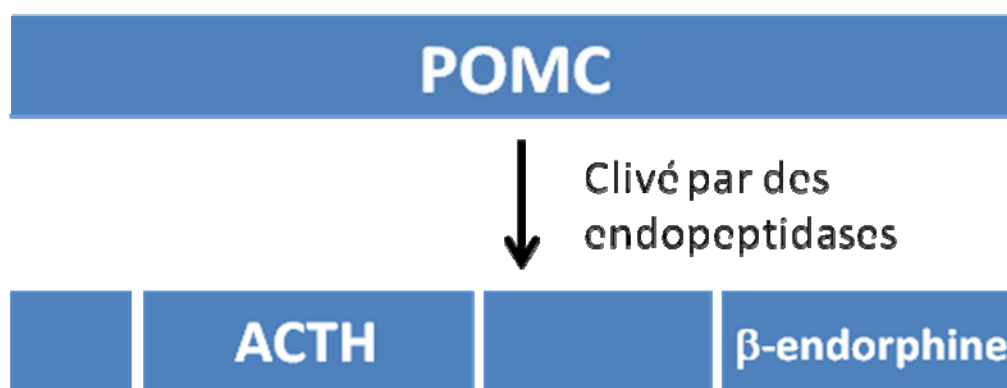


Figure I-5. Clivage de la pro-opiomélanocortine. La pro-opiomélanocortine est clivée par différentes endopeptidases dans l’hypophyse antérieure en réponse à différents signaux hormonaux, la β -endorphine et l’ACTH sont deux des nombreux peptides générés par le clivage de la POMC. POMC : pro-opiomélanocortine, ACTH : adrénocorticotrophine.

En plus de stimuler les sécrétions hypophysaires et surrénaliennes, la CRH peut aussi stimuler les réponses immunitaires et a une action pro inflammatoire. L’immunoneutralisation de la CRH périphérique provoque une réduction de l’inflammation chez le rat souffrant d’arthrite induite (Karalis, Sano et al., 1991).

Plusieurs études se sont penchées sur les effets comportementaux de la CRH, notamment sur son effet sur le stress. La majorité de ces études ont utilisé l’injection intracérébroventriculaire de l’hormone ou de divers agonistes ou antagonistes de l’hormone ou de ses récepteurs chez des rongeurs. Dans un état non stressé, une injection de CRH produit une activation des comportements normaux, mais dans un environnement stressant, les mêmes doses de CRH produisent une réponse au stress accrue comme une baisse d’activité exploratoire et un conditionnement à la peur plus

important. Des injections d'antagonistes de la CRH ou des récepteurs de la CRH ont l'effet inverse, soit une diminution des réponses comportementales au stress (Koob and Heinrichs, 1999; Smagin, Heinrichs et al., 2001).

La dépression est un autre trouble du comportement associé à la CRH. Des études cliniques préliminaires ont démontré une baisse des symptômes dépressifs avec une administration d'un antagoniste synthétique du récepteur CRHR1 (Holsboer and Ising, 2008). On observe aussi une augmentation de l'immunoréactivité de la CRH dans le liquide cébrospinal de patient souffrant de dépression (Nemeroff, Widerlov et al., 1984). Les niveaux de CRH plasmatique sont aussi augmentés chez les femmes enceintes ayant des symptômes dépressifs versus celles qui ne souffrent pas de dépression gestationnelle (Rich-Edwards, Mohllajee et al., 2008). Ceci suggère une hyperactivation de l'axe hypothalamus hypophyse surrénale dans la dépression (Arborelius, Owens et al., 1999).

La CRH et son récepteur CRHR1 sont souvent associés aux mécanismes de dépendance. En effet, plusieurs évidences démontrent une diminution des symptômes de sevrage à l'alcool ou aux opiacées par l'administration d'antagonistes des récepteurs de la CRH ou d'antagonistes spécifiques du récepteur CRHR1 (Lu, Liu et al., 2000). L'administration de ces antagonistes semble aussi protéger contre les rechutes après le sevrage.

3.5 Somatostatine

La somatostatine est une hormone souvent associée à un effet inhibiteur. Dans l'hypothalamus, la SS est produite en partie dans les PCN du noyau paraventriculaire,

ces neurones projettent vers l'éminence médiane où la SS est relâchée et acheminée à l'hypophyse antérieure. Cette hormone est aussi produite dans plusieurs autres types de neurones et autres régions du cerveau. Une des fonctions de la SS dans l'hypophyse antérieure est d'inhiber la relâche de la TSH en réponse à la thyrotropine. Une sécrétion hypothalamique de somatostatine induite par une élévation du niveau de glucose sanguin permet de réduire significativement la relâche de TSH induite par la TRH (Yang, Woo et al., 1996). Une injection de SS produit des effets similaires et provoque une inhibition de la sécrétion de TSH (Siler, Yen et al., 1974). À l'opposé, une immunosuppression de la SS produit une augmentation des niveaux basaux de TSH et augmente aussi sa réponse à la TRH (Arimura and Schally, 1976). La somatostatine agit aussi sur plusieurs autres hormones de l'hypophyse antérieure comme l'hormone de croissance (Hao, Li et al., 2010), l'hormone lutéinisante (Starcevic, Milosevic et al., 2002) et la gonadotrophine (Bhattarai, Kaszas et al., 2010).

Les effets de la SS ne se limitent pas seulement à l'inhibition d'hormones hypophysaires, la SS est aussi impliquée dans l'action de la leptine sur la prise alimentaire et les dépenses énergétiques. Une administration de SS ou d'un agoniste sélectif de la somatostatine peut prévenir l'activation de STAT3 dans les centres de satiété en réponse à la leptine (Stepanyan, Kocharyan et al., 2007). Cette diminution coïncide aussi avec la restauration d'une prise alimentaire normale, contrairement à l'effet anorexigène de la leptine dans ces régions du cerveau. Le fait que ces neurones cibles de la leptine expriment le récepteur de la somatostatine suggère une interaction directe (Stepanyan, Kocharyan et al., 2003).

La somatostatine est aussi produite par le pancréas dans les îlots de Langerhans, dans cet organe, la SS a une action paracrine sur les cellules alpha et bêta des îlots. Cette hormone participe au contrôle du niveau de glucose sanguin en agissant sur la sécrétion d'insuline et de glucagon. Plusieurs groupes ont noté une augmentation de la sécrétion d'insuline et de glucagon chez des souris $Ss^{-/-}$ en réponse aux stimuli appropriés (Strowski, Parmar et al., 2000; Hauge-Evans, King et al., 2009).

4 Amphibien

4.1 Généralités

Le *Xenopus laevis* est une grenouille africaine aux pattes postérieures griffées. Cet amphibien presque exclusivement aquatique est utilisé comme modèle animal dans les laboratoires depuis les années 1960. Un élément important qui a conduit à la popularité de ce modèle est le fait qu'il est possible de stimuler la pondaison chez les femelles en leur injectant de la gonadotrophine. Ceci permet de générer des embryons à tout moment de l'année sans être restreint par le rythme saisonnier de ces animaux (Gurdon and Hopwood, 2000). Comme tous les amphibiens, les embryons du *Xénopus* passent par un stade larvaire au cours de leur développement, ce qui les rend plus accessibles aux études développementales. Ces têtards subissent ensuite des changements morphologiques, ou métamorphose, avant d'atteindre le stade adulte. Les travaux des zoologistes Nieuwkoop et Faber pour produire la table du développement normal en 1956 ont aussi beaucoup contribué à l'utilisation du

Xenopus par les biologistes du développement. Cette table divise le développement du *Xenopus* en 66 stades allant de la fertilisation à la fin de la métamorphose (Niewkoop PD, 1994). Finalement, l'utilisation des morpholinos pour les expériences de perte de fonction a redonné un second souffle à ce modèle pour l'étude du développement.

4.2 Métamorphose

On peut définir la métamorphose comme une série d'événements morphologiques et biochimiques menant au remodelage de l'ensemble des organes et tissus d'un organisme immature. Ces événements hormono-dépendants incluent la perte des organes et structures nécessaire à la vie larvaire et la formation des organes et structures nécessaire à la vie adulte.

Le développement des têtards du *Xenopus* est divisé en trois étapes soit la prémétamorphose, la prométamorphose et le climax (Figure I-6). La prémétamorphose débute peu après l'éclosion, environ au stade 37. Cette étape est caractérisée par une croissance rapide des têtards et par des changements morphologiques mineurs. Elle se termine à la formation d'une glande thyroïde fonctionnelle au stade 53. C'est l'augmentation rapide des niveaux de sécrétion de la HT aux stades 53/54 qui marque le début de la prométamorphose. C'est à ce stade que les membres postérieurs commencent à se différencier. Finalement, le climax commence au stade 58 avec l'apparition des membres antérieurs. On peut observer à cette étape d'autres changements morphologiques majeurs comme par exemple la résorption de la queue et des branchies. (Niewkoop PD, 1994).

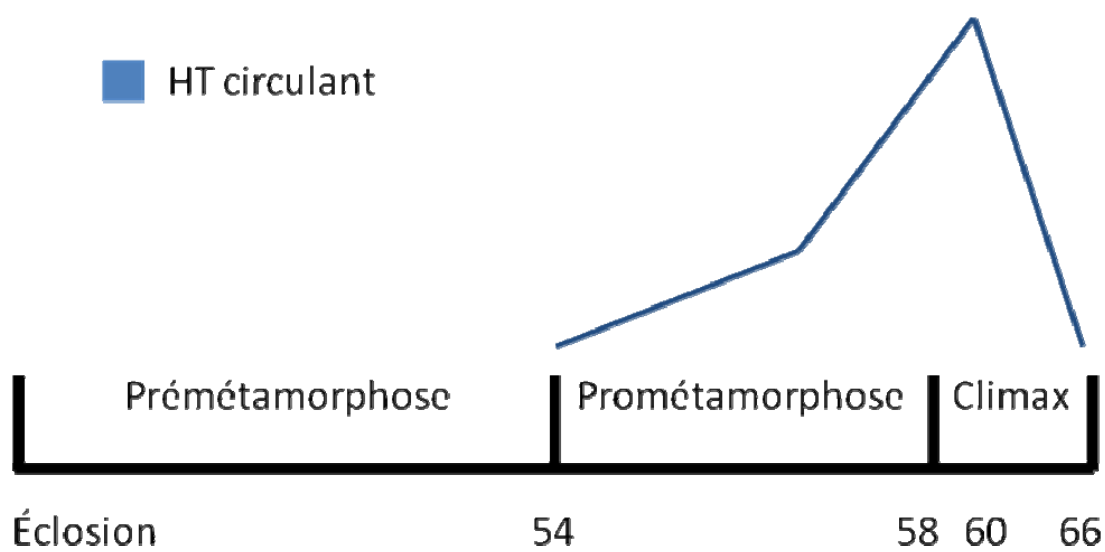


Figure I-6. Les différentes phases de la métamorphose. La métamorphose est divisé en trois phases, la prémétamorphose (éclosion-54), la prométamorphose (54-58) et le climax (59-66), le début de la prométamorphose coïncide avec le début de la sécrétion d'HT. HT : hormone thyroïdienne. (*Adapté de Morvan-Dubois, Demeneix et al., 2008*)

4.2.1 Contrôle hormonal

Les changements observés lors de la métamorphose sont tous sous le contrôle d'une seule hormone, l'HT. Les travaux de Gudernatsh, qui a réussi à induire la métamorphose en nourrissant des têtards avec de la glande thyroïde équine, et d'Allen, qui a bloqué la métamorphose par thyroïdectomie, ont permis d'associer l'HT à la métamorphose (Gudernatsch, 1912; Allen, 1916). Cette hormone est présente sous deux formes, la tétra-iodo-thyronine (T4) ou la tri-iodo-thyronine (T3). La T3 est la forme la plus active et provient de la déiodination de la T4 par la

déiodinase D2. La T3 peut être inactivée par une déiodination subséquente par la déiodinase D3 (Figure I-7) (Morvan-Dubois, Demeneix et al., 2008). L'HT agit via les récepteurs nucléaires TR α et TR β qui peuvent influencer l'expression de gènes en liant directement l'ADN.

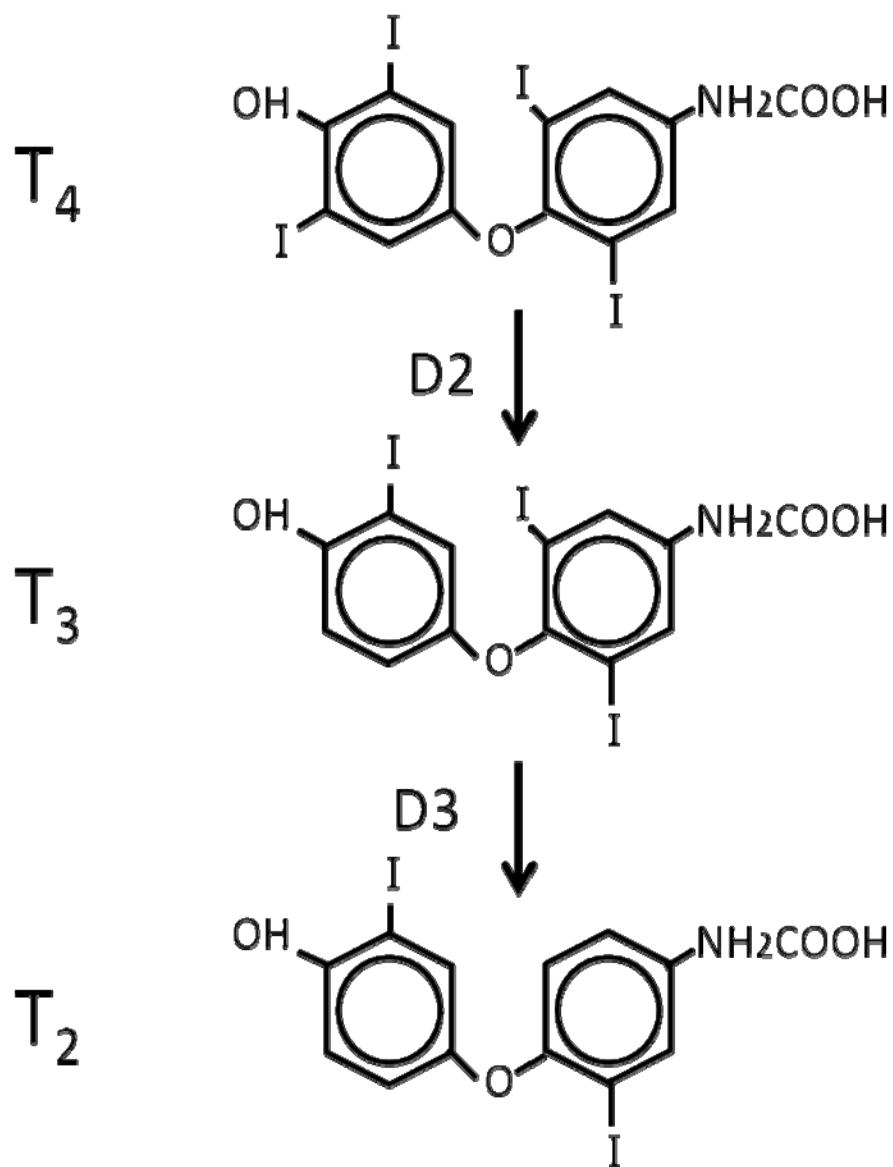


Figure I-7. Déiodination de l'hormone thyroïdienne. Représentation des trois formes majeurs de l'hormone thyroïdienne, La T4 est sécrétée par la glande thyroïde et est déiodiné par la déiodinase D2 pour donner la forme active T3. Cette forme peut subir une seconde déiodination par la déiodinase D3, qui produira la forme inactive T2. D'autres formes inactive de la HT ne sont pas représenté comme la « reverse » T3 et « reverse » T4. T4 : tétra-iodo-thyronine, T3 tri-iodo-thyronine, D2/3 : déiodinase 2/3.

L'HT commence à être produite à la prométamorphose, soit environ au stade 54. Cette hormone est produite de façon croissante pour ensuite revenir à des niveaux de base une fois la métamorphose complétée. Les récepteurs α et β de l'HT semblent jouer des rôles différents dans la métamorphose. En effet, TR α est le plus fortement exprimé durant toute la métamorphose dans les tissus en croissance. Son expression diminue au stade juvénile et adulte. L'expression de la TR β qui serait directement contrôlée par l'action de l'HT, est observée dans les tissus en résorption et est maximale lors du climax de la métamorphose (Furlow and Neff, 2006).

L'HT contrôle plusieurs aspects parfois opposés de la métamorphose comme la croissance et différenciation des membres ainsi que la résorption de la queue. Ceci peut s'expliquer partiellement par le fait que parmi les éléments régulés, directement ou indirectement, par l'HT et ses récepteurs, on retrouve à la fois des gènes de progression du cycle cellulaire et des gènes proapoptotiques (Das, Heimeier et al., 2009). Le développement des membres est un exemple de croissance et différenciation induite par l'HT. Les bourgeons de membres sont formés

indépendamment de l'HT, mais cette hormone est nécessaire à la réplication de l'ADN et la différenciation et la croissance des membres à partir de ces bourgeons (Brown, Cai et al., 2005). Les mécanismes de résorption de tissus contrôlés par l'HT incluent la perte des branchies et de la queue, il est nécessaire pour la survie du têtard de ne pas perdre ces structures avant la formation des organes qui vont les remplacer : les poumons et les membres. La résorption de ces structures requiert donc des concentrations de l'HT plus élevées que pour la formation des nouvelles structures. La queue, par exemple, a une expression constitutive de déiodinase D3, inhibitrice, et n'exprime pas la D2, activatrice, ce qui explique la faible sensibilité à l'HT. Au climax, les niveaux de D3 diminuent et les niveaux de D2 augmentent avec l'augmentation de sécrétion d'HT. Ces augmentations régulent aussi à la hausse les niveaux de récepteur TR β . Tous ces événements sont nécessaires à la résorption de la queue au bon moment (Brown and Cai, 2007). Il existe très peu d'information sur les changements et le remodelage du cerveau lors de la métamorphose, plusieurs neurones sont sélectivement détruits par apoptose tandis que de nouvelles connexions sont créées pour innover les organes nouvellement formés.

4.2.2 Hypothalamus

Le fonctionnement du système endocrinien des amphibiens semble être comparable à celui des autres vertébrés supérieurs. L'anatomie du système endocrinien amphibien se rapproche plus de celle des mammifères que de celle des poissons (Denver R. J., 2002). Plusieurs études démontrent l'importance de l'hypothalamus pour la métamorphose, Goos a observé qu'aucun têtard

prémétamorphique n'a atteint le stade de la métamorphose si la région préoptique de l'hypothalamus avait été retirée (Goos, 1969). Selon R. J. Denver, la région préoptique du *Xenopus* est homologue au PVN chez les mammifères (Boorse and Denver, 2004). D'autres auteurs ont fait des observations similaires comme Hanaoka chez des têtards *Rana pipiens* dont l'hypothalamus a été retiré (Hanaoka, 1967). En détruisant les connexions entre l'hypothalamus et l'hypophyse, Etkin et Sussman ont réussi à bloquer la métamorphose des larves de salamandres *Ambystoma* (Etkin and Sussman, 1961). L'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien est donc un élément essentiel à la métamorphose chez les amphibiens. Ceci place le PVN, ou région préoptique selon R. J. Denver, comme initiateur de la métamorphose.

Plusieurs observations suggèrent que la TSH, chez le têtard, n'est pas sécrétée en réponse à la TRH, mais plutôt par la CRH. La CRH est capable d'induire la sécrétion d'HT par les cellules thyroïdiennes cultivées in vitro (Boorse and Denver, 2004) Des injections de CRH, bovine ou d'amphibien, augmentent les niveaux de T4 et diminuent le temps nécessaire pour atteindre le stade adulte. Des injections similaires de TRH n'ont aucun effet sur les niveaux de T4 et la durée du développement métamorphique (Denver, 1993).

Section 2 : Développement

5 Développement de l'Hypothalamus

Le développement de l'hypothalamus et de presque toutes les structures du cerveau est caractérisé par trois phénomènes, la prolifération, la migration et la différenciation. La prolifération neuronale débute tout juste après la fermeture du tube neural, les cellules en prolifération forment la zone ventriculaire à la surface ventriculaire du tube neural (Markakis, 2002). Plusieurs cellules quitteront, de façon permanente, le cycle cellulaire pour devenir des neurones post-mitotiques et former le manteau du tube neural. Ces neurones vont migrer en s'éloignant de la zone ventriculaire proliférative et amorceront éventuellement leur différenciation terminale. Ce sont ces trois processus qui régissent le développement et le positionnement des noyaux hypothalamiques et de leurs neurones.

5.1 Modèle du développement medio-latéral de l'hypothalamus

Des études de datation utilisant les méthodes de marquage au 5-bromo-2'-déoxyuridine (BrdU) ou à la [³H]thymidine ont permis de déterminer que la majorité des neurones de l'hypothalamus naissent entre le 11^{ème} et 14^{ème} jour embryonnaire (E11-E14) chez la souris (Shimada and Nakamura, 1973). Les neurones du PVN et SON naissent entre E10.5 et E12.5 (Karim and Sloper, 1980). Ces études ont aussi mis en évidence que les premiers neurones à quitter le cycle cellulaire forment les structures les plus latérales de l'hypothalamus tandis que les neurones générés

tardivement forment les structures les plus médianes (Ifft, 1972; Shimada and Nakamura, 1973; Altman and Bayer, 1978).

Ces études suggèrent que les neurones appelés à former les différents noyaux de l'hypothalamus naissent dans la région ventriculaire et migrent de façon perpendiculaire au ventricule, ce qui correspond à la phase de migration radiale. Ces neurones amorcent par la suite la deuxième phase de migration, la migration tangentielle, pour gagner leur emplacement final au sein de l'hypothalamus. Selon Arnold-Aldea, les neurones hypothalamiques migrent par trois mécanismes différents. Premièrement, la majorité des neurones migrent de façon radiale à leur sortie de la zone ventriculaire. Plus tard au cours du développement, ces neurones vont migrer tangentiellement au ventricule (Arnold-Aldea and Cepko, 1996). Un deuxième mécanisme suggère qu'une petite partie des progéniteurs des différents noyaux peuvent se disperser dans la région ventriculaire proliférative et migreront perpendiculairement au ventricule à leur sortie de cette région (Arnold-Aldea and Cepko, 1996). Troisièmement, certains neurones peuvent, dès leur sortie de la région ventriculaire, adopter un patron de migration tangentiel pour ensuite migrer radialement vers la surface du cerveau (Figure I-8) (Arnold-Aldea and Cepko, 1996). Le premier mécanisme semble être celui adopté par la majorité des neurones hypothalamique tandis que les deux autres sont adoptés par une fraction de ces neurones. Ces trois mécanismes de migration ont probablement des rôles spécifiques et distincts dans la formation des différents noyaux hypothalamiques.

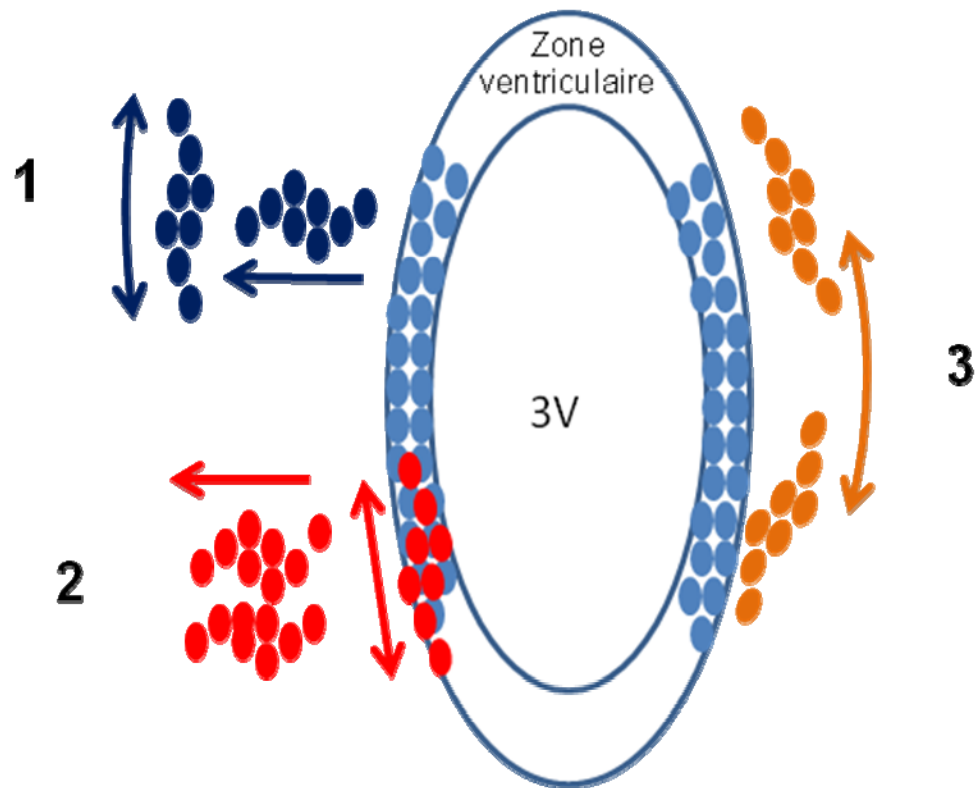


Figure I-8. Différents mécanismes de migration radiale et tangentielle. Les neurones de l'hypothalamus migrent selon trois mécanismes. 1- La majorité des neurones migrent radialement dès leur sortie de la zone ventriculaire pour ensuite se disperser dans le manteau. 2- Certains progéniteurs peuvent se disperser au sein même de la zone ventriculaire et migrer radialement à leur sortie. 3- Quelques rares neurones peuvent se disperser parallèlement à la surface du ventricule dès leur sortie de la zone ventriculaire. 3V : troisième ventricule. (*Adapté de Arnold-Aldea, S. A. and Cepko C. L. 1996*).

5.2 Modèle des deux couches

Le manteau de l'hypothalamus antérieur en développement peut être divisé en deux couches, une couche latérale qui deviendra l'hypothalamus ventro-latéral, et une couche plus médiane qui donnera naissance au PVN (Caqueret, Boucher et al., 2006) (Figure I-9). Ces deux couches sont caractérisées par l'expression de trois catégories de gènes. Les gènes de la première catégorie, comme *Brn2* et *Nkx2.2* sont exprimés dans la couche médiane de l'hypothalamus antérieur, qui donnera naissance au PVN. Les gènes de la deuxième catégorie, comme *Single minded (Sim2)* et *Rgs4*, sont exprimés dans la couche latérale, qui donnera naissance à l'hypothalamus latéral. On retrouve aussi des gènes de la troisième catégorie qui sont exprimés à la fois dans la couche médiane et latérale comme *Sim1* et *Orthopedia (Otp)*, ces gènes sont requis pour le développement des deux couches de l'hypothalamus qui donneront naissance au PVN et l'hypothalamus latéral (Caqueret, Boucher et al., 2006). En accord avec le modèle du développement médio-latéral, les neurones de l'hypothalamus latéral sont différenciés à E11.5 tandis que les neurones qui forment le PVN se différencient entre E13.5 et E15.5 (Michaud, Rosenquist et al., 1998; Goshu, Jin et al., 2004). Des observations similaires ont aussi été observées chez les embryons de poulets. *Brn2* et *Sim2* sont exprimés dans des domaines complémentaires médio-latéral, alors qu'*Otp* est exprimé à la fois dans la couche médiane que latérale (Caqueret, Coumailleu et al., 2005). Ces similarités dans le développement de l'hypothalamus antérieur de ces deux espèces semblent indiquer que la formation des deux couches est un événement développemental conservé chez la plupart des vertébrés.

6 Développement du Noyau Paraventriculaire de l'Hypothalamus

Les précurseurs du PVN quittent le cycle cellulaire entre E10.5 et E12.5 chez la souris (Karim and Sloper, 1980). Les cellules appelées à former le PVN vont se regrouper et former un noyau adjacent au troisième ventricule, tandis que les neurones qui formeront le SON migreront jusqu'à la surface du cerveau (Altman and Bayer, 1978). À partir de E12.5 jusqu'à la naissance les différentes lignées neurosécrétrices du PVN vont se différencier, il est possible de suivre cette différenciation terminale par la production des différents neuropeptides que sécrètera chacune de ces lignées.

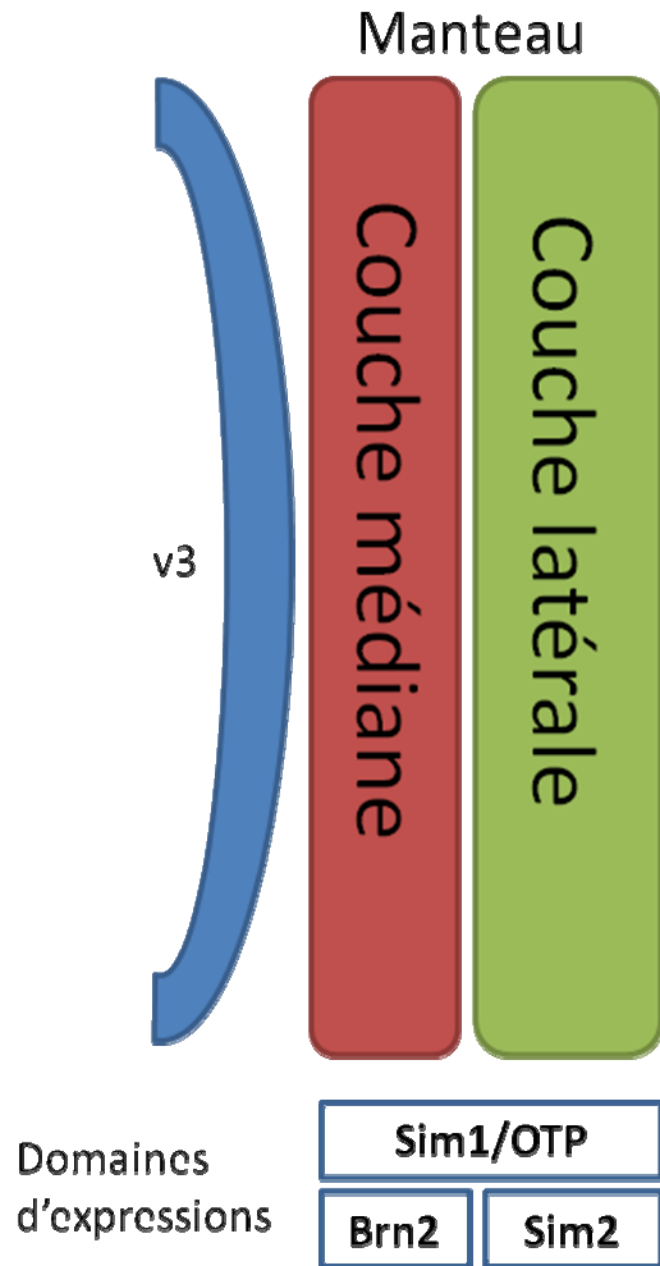


Figure I-9. Modèle du développement médio-latéral de l'hypothalamus. On retrouve trois catégories de gènes dans l'hypothalamus latéral, la catégorie 1 comprend des gènes comme Brn2 et est exprimé dans la couche médiane qui donnera naissance au PVN. Les gènes de la catégorie 2 sont exprimés dans la couche latérale, comme

Sim2, qui donnera naissance à l'hypothalamus latéral. Finalement on retrouve des gènes de la catégorie 3, qui eux sont exprimé dans les deux couches et qui sont nécessaire au développement de celles-ci, comme Sim1 et OTP.

6.1 Cascade des facteurs de transcription

Le développement du PVN implique une cascade de facteurs de transcription qui a récemment été décrite (Figure I-10) (Caqueret, Yang et al., 2005). Chacun de ces facteurs est essentiel à la différenciation d'une partie ou de toutes les populations neuronales du PVN, tel que révélé par plusieurs études de pertes de fonctions (Nakai, Kawano et al., 1995; Michaud, Rosenquist et al., 1998; Wang and Lufkin, 2000; Hosoya, Oda et al., 2001; Goshu, Jin et al., 2004). SIM1 et son partenaire de dimérisation « Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 » (ARNT2) ainsi qu'OTP sont à la tête de cette cascade. Ces facteurs de transcription agissent en parallèle et sont nécessaire à la différenciation terminale de toutes les populations neuronales du PVN en maintenant l'expression de Brn2 et Sim2 (Michaud, Rosenquist et al., 1998; Acampora, Postiglione et al., 1999). Ces derniers sont responsables du développement de populations plus restreintes neurones. Brn2 est requis pour le développement de tous les neurones AVP, OT et CRH alors que SIM2 est requis pour le développement de sous-populations de neurones sécrétant la SS et la TRH (Nakai, Kawano et al., 1995; Schonemann, Ryan et al., 1995; Goshu, Jin et al., 2004).

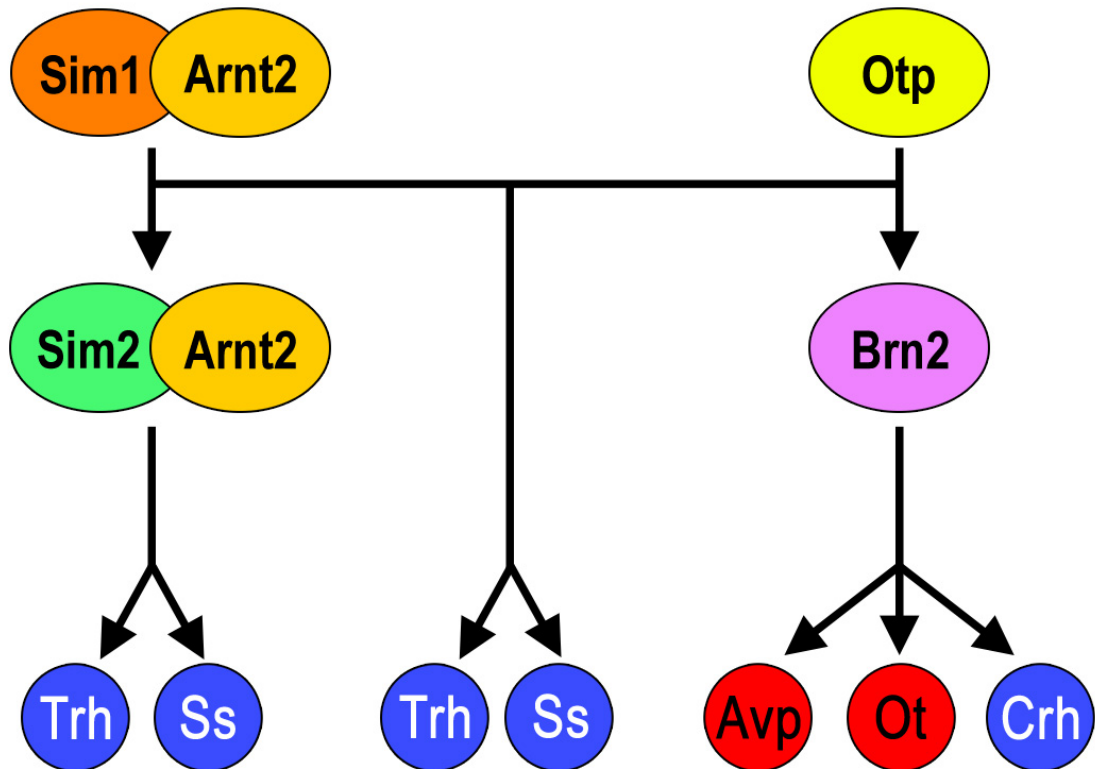


Figure I-10. Cascade de facteurs de transcription régulant la différenciation des cinq types cellulaires majeurs qui peuplent le PVN. SIM1 et OTP agissent en parallèle à la tête de cette cascade pour maintenir l'expression de BRN2 et SIM2 qui sont quant à eux requis pour la différenciation terminale de types cellulaires distincts.

6.1.1 *Sim1* et *Arnt2*

Sim1 est un facteur de transcription qui a été identifié pour la première fois chez la drosophile. Ce gène est requis pour le développement de la ligne médiane du système nerveux central de la mouche (Thomas, Crews et al., 1988; Nambu, Franks et al., 1990). *Sim1* fait partie de la famille des facteurs de transcription bHLH-PAS.

Cette famille est caractérisée par un domaine basique qui lie l'ADN, d'un domaine hélice-boucle-hélice qui participe à la dimérisation une paire de motifs PAS (pour *Per Arnt Sim*, correspondant aux trois premiers gènes où ce motif a été identifié). Les membres de la famille des bHLH-PAS sont actifs sous forme d'homodimères ou hétérodimères. Ce sont les domaines PAS qui confèrent la spécificité des partenaires d'hétérodimérisation (Huang, Ederly et al., 1993; Sekine, Mimura et al., 2006).

Au cours du développement embryonnaire de la souris, *Sim1* est exprimé dans le PVN, le SON et le noyau périventriculaire antérieur. Tout comme *Sim* chez la drosophile, *Sim1* est un important régulateur du développement de plusieurs lignées neuronales chez la souris, incluant celles qui composent le PVN. Une perte homozygote de *Sim1* se traduit par une létalité néonatale et l'absence de PVN et SON (Michaud, Rosenquist et al., 1998). Au stade embryonnaire, l'expression des facteurs de transcription *Brn2* et *Sim2* sont diminuées dans le PVN et le SON prospectifs, indiquant que ces derniers gènes agissent en aval de *Sim1* dans la cascade (Michaud, Rosenquist et al., 1998). L'analyse des embryons mutants suggèrent que *Sim1* est requis pour la différenciation des neurones du PVN/SON, mais aussi pour leur migration. En effet, les souris homozygotes pour un allèle nul de *Sim1* démontrent des défauts dans la migration des cellules du PVN vers la surface ventrale latérale du cerveau pour former le SON. Les observations de (Xu and Fan, 2007) suggèrent que *Sim1* agit en amont de la *Plexine C1* et est requis pour la migration des MCN du PVN vers le SON.

Il a été démontré que SIM1 et la protéine bHLH-PAS ARNT2 peuvent hétérodimériser. De plus, *Arnt2* est fortement exprimé dans un domaine

hypothalamique correspondant à celui de *Sim1* (Michaud, DeRossi et al., 2000). Le fait que la perte d'*Arnt2* produit les mêmes défauts hypothalamiques que pour la perte de *Sim1* renforce l'idée qu'ARNT2 est le partenaire de dimérisation de SIM1 in vivo.

Les souris n'ayant qu'une perte hétérozygote de *Sim1* survivent et sont fertiles, mais développent une obésité sévère à partir de la quatrième semaine de vie. Cette obésité est le résultat d'une hyperphagie sans changement au niveau des dépenses énergétiques (Michaud, Boucher et al., 2001). La modulation des niveaux d'expression de *Sim1* dans le PVN de souris adultes de type sauvage à l'aide de vecteurs adénoviraux affecte la prise alimentaire (Yang, Gagnon et al., 2006). Ces observations supportent l'hypothèse d'un rôle physiologique de SIM1 dans la prise alimentaire. De fait, le PVN agit comme relais entre l'ARC, un noyau sensible à la leptine, et les neurones préganglionnaires du système nerveux autonome, qui sont impliqués dans la modulation de la prise alimentaire (Swanson and Sawchenko, 1983). Une diminution des niveaux d'expression de l'*Ot* a récemment été identifiée comme une cause de l'hyperphagie des souris hétérozygotes pour *Sim1* (Kublaoui, Gemelli et al., 2008).

Le rôle de SIM1 dans la prise alimentaire est conservé chez l'humain. Une translocation équilibrée interrompant un allèle de *Sim1* a été associée à une obésité hyperphagique chez un enfant (Holder, Butte et al., 2000). Des études d'association sur le génome entier démontrent un lien entre l'obésité et le locus de *Sim1* (Meyre, Lecoœur et al., 2004) et l'identification de variants rares dans la séquence codante de *Sim1* chez des individus obèses (Ahituv, Kavaslar et al., 2007) semble renforcer la possibilité que ce dernier gène soit impliqué dans l'obésité chez l'humain.

6.1.2 *Sim2*

Sim2 est un paralogue de *Sim1* et agit en aval de ce dernier pour la différenciation terminale de deux lignées de neurones du PVN soit les neurones sécrétant la SS et la TRH (Goshu, Jin et al., 2004). Les souris ayant une perte homozygote de *Sim2* meurent quelques jours après la naissance à cause de troubles respiratoires (Goshu, Jin et al., 2002). Les études du PVN des embryons n'exprimant pas *Sim2* révèlent que ce dernier est nécessaire à la différenciation terminale d'environ 80% des neurones exprimant la *Ss* et d'environ 40% des cellules exprimant la *Trh* (Goshu, Jin et al., 2004). La perte hétérozygote de *Sim2* réduit le nombre de cellules SS de moitié et les cellules TRH de 20% par rapport aux souris non mutées. Ceci suggère une contribution dose-dépendante de SIM2 à la différenciation de ces lignées cellulaires (Goshu, Jin et al., 2004). La perte d'une copie de *Sim1* chez les souris mutantes pour *Sim2* ne fait qu'aggraver le phénotype, indiquant que SIM1 serait capable de compenser, quoi que seulement en partie, la perte de *Sim2*. Finalement, le fait que *Sim2* n'est pas exprimé dans le PVN de souris mutante pour *Sim1*, sans que l'inverse soit vrai, confirme la position en aval de *Sim1* de ce gène dans la cascade des facteurs de transcription régulant le développement du PVN (Goshu, Jin et al., 2004).

6.1.3 *Otp*

Le facteur de transcription OTP agit en parallèle de SIM1 et régule plusieurs aspects du développement des neurones du PVN (Caqueret, Yang et al., 2005). OTP fait partie de la famille des facteurs de transcription à homéodomaine (Simeone,

D'Apice et al., 1994). Cette famille de gènes joue un rôle important dans le développement embryonnaire et fœtal comme illustré par ses membres les plus connus, les gènes *Hox*, qui régulent le développement de l'axe antéropostérieur (Holland and Takahashi, 2005; Mallo, Wellik et al., 2010). *Otp* est exprimé essentiellement dans les mêmes régions de l'hypothalamus que *Sim1*. *Otp* est aussi exprimé dans l'ARC, un autre noyau de l'hypothalamus (Simeone, D'Apice et al., 1994).

Les souris mutantes pour *Otp* ont un phénotype très similaire aux mutants *Sim1*. Les mutants homozygotes meurent au cours des trois premiers jours après la naissance. Le PVN est absent chez ces animaux (Acampora, Postiglione et al., 1999; Wang and Lufkin, 2000). En plus des défauts de différenciation terminale, les mutants homozygotes pour *Otp* présentent aussi une diminution de la prolifération cellulaire sans augmentation de l'apoptose et une migration cellulaire anormale (Acampora, Postiglione et al., 1999; Wang and Lufkin, 2000). OTP est requis pour le maintien de l'expression de *Brn2* et de *Sim2* (Michaud, Rosenquist et al., 1998; Acampora, Postiglione et al., 1999). Par ailleurs, SIM1 ne contrôle pas l'expression d'*Otp* et vice-versa. Collectivement, ces observations suggèrent que SIM1 et OTP agissent en parallèle pour activer les mêmes effecteurs. OTP est aussi impliqué dans une cascade de facteurs de transcription responsable du développement de plusieurs types de neurones au sein du noyau arqué, incluant une population de neurones produisant la SS, en agissant en aval de *Nkx2.1* (Acampora, Postiglione et al., 1999).

6.1.4 *Brn2*

Brn2 est un membre de la famille des facteurs de transcriptions à domaines POU. Cette famille de facteurs de transcription est divisée en six classes et BRN2 fait partie de la troisième classe, d'où son appellation POU3F2 (Li, He et al., 1993). Ce facteur de transcription agit en aval de *Sim1* et *Otp* pour assurer la différenciation terminale des neurones magnocellulaires du PVN et du SON sécrétant l'AVP et l'OT, ainsi que les neurones parvocellulaires du PVN sécrétant la CRH (Nakai, Kawano et al., 1995; Schonemann, Ryan et al., 1995). La perte homozygote de *Brn2* est létale quelques jours après la naissance, mais on n'observe pas la désorganisation morphologique du PVN qui caractérise les souris mutées pour *Sim1* ou *Otp* (Nakai, Kawano et al., 1995; Schonemann, Ryan et al., 1995). Ces souris semblent souffrir de malnutrition sévère et sont systématiquement 50 % à 60 % plus petites que des contrôles du même âge (Nakai, Kawano et al., 1995; Schonemann, Ryan et al., 1995). *Brn2* semble être requis pour les étapes finales de la différenciation neuronale. Plusieurs groupes ont démontrés, *in vitro*, que BRN2 est capable de lier le promoteur de la CRH et d'en activer l'expression (Li, He et al., 1993; Schonemann, Ryan et al., 1995; Ramkumar and Adler, 1999). Cette interaction n'a toutefois pas pu être démontrée *in vivo*. La surexpression de *Brn2* dans le PVN de rats adultes, par injection stéréotaxique d'adénovirus exprimant *Brn2*, n'a aucun effet sur l'expression de *Crh* (Wong and Murphy, 2003). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence entre les effets *in vitro* et *in vivo* d'une telle surexpression. *Brn2* n'est peut-être pas un facteur limitant dans cette interaction, des niveaux basaux de ce facteur de transcription sont alors suffisants pour l'expression de la *Crh*. Il pourrait

aussi exister un mécanisme endogène pour limiter l'activité transcriptionnelle de BRN2 au-delà d'un seuil critique (Wong and Murphy, 2003).

7 Hypothèses et objectifs

La dissection du programme développemental du PVN présente un double intérêt. D'une part, le PVN est composé d'un petit nombre de cellules qui forment un noyau compact. En vertu de cette relative simplicité, le PVN représente un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes sous-jacents à la production de la diversité neuronale dans le cerveau en développement. D'autre part, comme l'illustre nos travaux sur SIM1, l'étude du développement du PVN a le potentiel de conduire à l'identification de gènes qui peuvent être associés à des maladies communes tel que l'obésité ou l'hypertension artérielle.

Le développement du PVN est contrôlé par une cascade de facteurs de transcription, SIM1 et OTP sont à la tête de cette cascade. L'analyse du transcriptome du PVN par (Caqueret, Boucher et al., 2006) a permis d'identifier de nombreux facteurs de transcription qui ont le potentiel d'agir le long de cette cascade. Pour valider les facteurs de transcriptions identifiés précédemment au sein du laboratoire, nous voulons développer un paradigme de perte de fonction qui permettrait l'étude à grande échelle de ces nombreux gènes. Nous croyons pouvoir utiliser le *Xenopus laevis* pour la validation fonctionnelle de ces gènes candidats grâce à un paradigme de perte de fonction par l'injection de morpholinos. Notre hypothèse est donc que le développement du PVN est suffisamment conservé entre la souris et le *Xenopus* pour

nous permettre d'utiliser ce modèle pour effectuer la validation des facteurs de transcription identifiés chez la souris.

Le but de mon projet est de caractériser le PVN en développement chez cet amphibien et de déterminer s'il est possible d'utiliser ce modèle pour nos études fonctionnelles. Pour vérifier mon hypothèse et valider l'usage du *Xenopus*, j'étudierai l'expression de différents facteurs de transcriptions impliqués dans le développement du PVN, soit OTP, SIM1, SIM2 et BRN2 par hybridation *in situ*. Je vais également étudier la différenciation terminale de cinq lignées neuronales du PVN dont le développement est sous le contrôle des facteurs de transcriptions mentionnés plus tôt. Je suivrai donc la différenciation terminale de ces neurones en examinant les patrons d'expression des différents neuropeptides sécrétés par ces cinq lignées, soit l'AVP, l'OT la CRH et la TRH. Finalement, je vais examiner la relation spatio-temporelle entre les facteurs de transcriptions et les marqueurs de différenciation terminale de ces neurones et comparer leur relation entre l'amphibien et la souris.

Chapitre II : Development of the anterior hypothalamus in the amphibian

Khalil Bouyakdan¹ and Jacques L. Michaud^{1*}

¹Ste-Justine hospital research center, Montreal, Qc, Canada

*Correspondence: Jacques L. Michaud,

Research Center,
Hôpital Sainte-Justine,
3175 Côte Sainte-Catherine,
Montreal, Quebec,
Canada H3T 1C5

Keywords :

Contribution

J'ai, en collaboration avec mon directeur de recherche Jacques L. Michaud, élaboré l'ensemble des expérimentations proposées dans l'article. J'ai aussi effectué toute les expériences qui ont mené, ou mèneront, à la publication de cet article. J'ai réalisé l'écriture de cet article en collaboration avec mon directeur de recherche Jacques L. Michaud.

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, TRH, and CRH. Very little is known about how the differentiation of these cell types is regulated in amphibians. Here, we have systematically compared the expression of *Sim1*, *Sim2*, *Brn2*, and *Otp* with that of the markers of terminal differentiation TRH, CRH, vasopressin and oxytocin during development of *Xenopus laevis*. 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 amphibians.

Keywords : *Xenopus laevis*, hypothalamus, paraventricular nucleus, transcription factors, terminal differentiation, Trh, Crh, Avp, Sim1, Otp, Brn2.

Introduction

The hypothalamus contains small nuclei interspaced between less defined regions. Different physiological functions have been assigned to these distinct areas of the hypothalamus in mammals. In particular, the paraventricular (PVN) and the supraoptic nuclei (SON), which is formed by cells that migrate out of the prospective PVN during development, play a critical role in several homeostatic processes, such as the maintenance of energy and fluid balance, the response to stress and the regulation of blood pressure. Structurally, the PVN is composed of magnocellular and parvocellular neurons, whereas the SON is mainly composed of the latter type of neurons (Swanson and Sawchenko, 1983; Sawchenko, Imaki et al., 1992). Magnocellular neurons of the PVN/SON project their axons to the posterior pituitary where they secrete either vasopressin (AVP) or oxytocin (OT) in the general circulation. AVP is a key regulator of fluid balance, acting to stimulate water uptake by the kidney tubule, whereas OT promotes lactation, stimulates natriuresis and mediates at least in part dehydration-induced decrease of sodium and food intake (Gimpl and Fahrenholz, 2001; Ball, 2007; Miedlar, Rinaman et al., 2007). AVP and OT production is mutually exclusive, defining two distinct types of magnocellular neurons (Mohr, Bahnsen et al., 1988).

The parvocellular population of PVN neurons is more heterogeneous than the magnocellular population and has not been as well characterized. Distinct populations of parvocellular neurons can be distinguished based on the fact that they send axons to at least one of the following targets: 1) the medial eminence where they secrete several factors, including TRH and CRH; these factors are transported via the small

vasculature to the anterior pituitary where they modulate the secretion of pituitary hormones; 2) the dorsal vagal complex (DVC) of the brainstem, which includes the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) and the adjacent nucleus of the solitary tract (NST); the DMV contains preganglionic neurons of the parasympathetic nervous system, whereas the NST receives visceral sensory information via vagal afferences; and 3) to sympathetic centers located in the spinal cord thoracolumbar intermediolateral cell column (Saper, Loewy et al., 1976; Swanson and Kuypers, 1980; Sawchenko and Swanson, 1982; Rogers and Nelson, 1984).

A cascade of transcription factors involved in the specification of PVN/SON neurons has been described (Caqueret, Yang et al., 2005). The bHLH-PAS protein SIM1 and the homeobox-containing protein OTP are required for the development of all PVN/SON neurons in mice. SIM1 and OTP function in parallel for the development of these cells and upstream of POU protein BRN2 and the bHLH-PAS protein SIM2. In turn, BRN2 is required for the development of *Avp*-, *Ot*-, and *Crh*-expressing cells, whereas SIM2 is required for the development of a subset of *Trh*-expressing cells. Recent work has recently found that loss of the zinc finger transcription factor FEFZ2 affects the development of *Ot*-expressing cells in zebrafish (Blechman, Borodovsky et al., 2007). At this point in time, it is unclear, however, whether this function of FEFZ2 has been conserved in mammals.

Very little is known about the ontogeny of the PVN in the amphibian and about the transcriptional regulation of its development. This question is of special interest in view of the importance of the PVN for the control of metamorphosis in

these animals. In order to characterize the development of the PVN in amphibians, we performed a systematic marker analysis.

Materials and methods

Animals

Xenopus laevis adults were sacrificed by immersion in a bath containing 300 mg/L Benzocain solution (Sigma-Aldrich E1501). Brains were then dissected and fixed in 4 % paraformaldehyde. Tadpoles were staged according to (Niewkoop PD, 1994) and anesthetized in 0.1% buffered Tricain (ms-222 Sigma-Aldrich A5040) before fixation. Tadpoles of stages 30-48 were directly fixed, whereas those of stage 50 and older were dissected prior to fixation.

Tissue preparation

Freshly dissected tissue were promptly fixed overnight in 4 % paraformaldehyde at 4°C, rinsed in PBS and cryopreserved in 30% sucrose before embedding in TissuetTek OCT compound and stored at -80° C. Embryos were then coronaly cryosectioned at 12 µm and conserved at -80° C for short periods of time.

Cloning of *Xenopus* in Situ probes

cDNAs were generated using total RNA from either stage 45 whole embryos or from adult brains. Two different strategies were used to design PCR primers for the amplification of cDNA fragments. For some genes (*Sim2*, *Brn2*, *Fezf2*, *Trh*, *Nkx2.1*), primers corresponding to the known *X. laevis* mRNA sequence were designed. For genes that had not yet been sequenced in *X. laevis* (*Otp*, *Sim1*, *Avp*), primers corresponding to regions conserved in mice and *X. tropicalis* were designed.

The sequences of the primers used are as follow:

Otp F: GAAGAAGCGCAAGAAGACCA *Otp* R: AGACTGTGTGCTCAAGTGCT

Sim1 F: AGCTGACTGGGAACAGCATT *Sim1* R: TGGAAAATCCAAAGCAAAGG

Sim2 F: GGTGAAGTCCAAACCAAGGA *Sim2* R: TCTGAATTGTGATGGGCAA

Brn2 F: ACCTAGTGCACCCTGCTCAT *Brn2* R: CAAAACCAGACCCTGACCAC

Fezf2 F: GAGTCAGGCGCAAAGAAAAC *Fezf2* R: CACTGTGGGTCAGTTTGTGG

Nkx2.1 F: ATAGGCAGTCGCAGGTGTCT *Nkx2.1* R: GTTTGTTTGGTGGCTCTGGT

Trh F: GTCTGGTGGTTGCTGCTTCT *Trh* R: TAGGCATTAGGGCCTTCACA

Crh F: GAAGTTCCAGCTGTGGGTGT *Crh* R: TGGGCTATTTGCTCAGCTCT

Avp F: AGCTTCGGTCCCTGCTTGTT *Avp* R: GGCTCAGTAGTATTGGTGCT.

PCR conditions are available upon request.

Immunofluorescence

Cryosections were preheated at 54°C for 15 min before being postfixed in 4 % paraformaldehyde. Tissue was then blocked in 5 % serum in PBS 1X with 0.3 % Triton for 1 h, incubated with a rabbit anti-oxytocin polyclonal antibody (Abcam : ab2078) 2-4 h in 1.5 % serum in PBS 1X with 0.3 % Triton and then incubated 1 h

with secondary antibody, all at room temperature. Slides were mounted with either Kayser's Glycerogel or Cytoseal after dehydration.

***In Situ* hybridization**

In Situ hybridizations were performed with a TSA amplification kit from Perkin Elmer. Cryosections were preheated, postfixed 20 min in 4 % PFA, quenched in 1% H₂O₂ in PBS, permeabilized with proteinase K, fixed again and washed in 2X SSC solution before over night incubation with a 1/3 diluted Dig-RNA probe at 70° C. Hybridized slides were then washed in formamide/SSC buffer at 65° C then in 0.2X SSC at 65° C before being stored shortly in Tris-NaCl-Tween buffer prior to blocking with the blocking buffer provided in the kit. Slides were then incubated with POD coupled anti-Dig antibody for 30 min, amplified with DNP amplification reagent provided in kit 5-10 min, incubated with anti-DNP-AP and detected using NBT/BCIP as a chromogenic substrate for the alkaline phosphatase.

Results and Discussion

In order to characterize the development of the anterior hypothalamus in the amphibian, we studied the expression of *Sim1*, *Sim2*, *Otp*, *Brn2*, *Fefz2*, *Nkx2.1*, *Avp*, *Crh* and *Trh* by *in situ* hybridization at different timepoints during development of *Xenopus laevis* as well as in the adult (Table 1). *Otp*, *Sim1*, *Sim2*, and *Brn2* are expressed as early as stage 30-33 in the prospective hypothalamus in a domain that lines the third ventricle (Fig. 1 A-D). At this stage, markers of terminal differentiation are not yet expressed. *Trh* and *Avp*, but not *Crh* start to be expressed in a small number of cells in the lateral aspect of this domain between stage 35 and 39 (Fig. 1 E-H). The co-expression of these markers of terminal differentiation with the transcription factors studied here strongly suggests that the function of the later has been conserved in amphibians.

At stage 44-46, the domains of expression of *Otp*, *Sim1*, *Sim2*, and *Brn2* as well as of *Trh* and *Avp* elongate along the dorso-ventral axis, lining the medial forebrain bundle (Fig. 2 A-L). Interestingly, *Fefz2* is also expressed in this domain, suggesting that it may also play a role in the specification of PVN neurons in the amphibian (Fig. 2 C). The expression of all these transcription factors appears to overlap but do not extend into the adjacent domain of *Nkx2.1* expression.

At the premetamorphic stage 51, *Crh* begins to be expressed in a group of cells that are found dorsally in the same domain as that occupied by *Avp* (Fig. 3 A-C). In contrast, at this stage, *Trh*-expressing cells are located laterally. Few days later, at

the onset of metamorphosis (stage 54), similar patterns of expression can be observed with *Avp*, and *Crh* being expressed dorso-medially and *Trh* being expressed more laterally (Fig. 4 A-L). Immunohistochemistry showed that OT is produced in a domain that is similar to that of *Avp* at this stage (Fig. 4 C, D, G, H, K, L). Thyroid hormone controls virtually all aspects of metamorphosis (Yaoita and Brown, 1990; Brown, Wang et al., 1995; Brown, Cai et al., 2005; Brown and Cai, 2007). During this developmental stage, its production is stimulated by CRH rather than by TRH (Denver, 1993; Boorse and Denver, 2004), as typically observed in adult amphibian and other vertebrates. The increase in the number of *Crh*-expressing neurons thus correlates with the requirement for thyroid hormone during metamorphosis.

At stage 60, which corresponds to the climax of metamorphosis, a second domain of *Trh* expression appears (Fig. 5 A, D, G). This domain is located medially and is included within that of *Avp* and *Ot*. This medial domain, which is characterized by the expression of *Avp*, *Ot*, *Crh* and *Trh*, would correspond to the PVN, whereas the lateral domain of *Trh* expression would correspond to the lateral hypothalamus. Interestingly, expression of the transcription factors studied here are dramatically reduced during the whole period of metamorphosis (not shown), suggesting that specification of neurosecretory neurons is completed by this stage. This possibility is supported by the observation few cells are dividing in the proliferative layer of the hypothalamus during metamorphosis (Wullimann, Rink et al., 2005).

In the adult, the PVN is organized as an elongated domain that lines the third ventricle. *Avp*, *Ot*, *Crh* and *Trh* cells are found at all levels along the dorso-ventral axis of this domain (Fig. 6 A-S). However, *Avp* and OT domains are wider than those

of *Trh* and *Crh*. *Otp*, *Sim1*, *Brn2* and *Fezf2*, but not *Sim2*, were also expressed in the adult anterior hypothalamus, suggesting that they may play some role in mature cells (Fig. 7 A-D). Interestingly, our analysis revealed the presence of strings of cells that expressed the PVN markers studied here. These strings were oriented in parallel to the ventricle and were mainly found in the medial aspect of the PVN (Fig. 6, 7). Finally, immunohistochemistry showed that OT axons were all directed ventro-laterally (Fig. 6 O, T).

The early development of the anterior hypothalamus involves waves of neurogenesis, with the first born neurons occupying the most lateral aspect of the mantle layer and the later born neurons settling more medially (Caqueret, Boucher et al., 2006). In mice, these earlier born neurons express several markers, including *Trh*, which at this stage defines the prospective lateral hypothalamus. We also found a domain of *Trh* expression early during amphibian development that occupies the most lateral aspect of the hypothalamus. Later born neurons will give rise to the PVN/SON, which is located medially. In the amphibian, the PVN is also located medially, as shown by the overlapping domains of *Avp*, *Ot*, *Crh* and *Trh* expression. A similar organization of the developing anterior hypothalamus into 2 layers has been described in the chick embryos (Caqueret, Coumaillieu et al., 2005).

Most neurons in the hypothalamus of the chick embryo initially migrate radially after exiting the cell cycle. Later on, a subset of them will migrate tangentially in the mantle layer (Arnold-Aldea and Cepko, 1996). Although the PVN occupies a relatively compact area in mice, we observed a dramatic dorso-ventral elongation of the prospective PVN in the developing amphibian during

metamorphosis. This elongation does not appear to involve the addition of new cells since it occurs after completion of PVN neurogenesis (Wullimann, Rink et al., 2005). One possibility thus is that this elongation results from tangential migration of neurons. Interestingly, the adult PVN is characterized by the presence of string of cells in the medial aspect of the PVN, as if these cells were migrating one behind the other along well-defined corridors. The cellular and molecular basis of this phenomenon remains unclear. Another intriguing observation is that we did not identify a SON in the amphibian. It is possible that the signals involved in inducing these cells to migrate are not conserved in the amphibian. Alternatively, these signals might be involved in inducing the dorso-ventral elongation of the PVN.

As it is also the case in mice, we did not observe any indication that the different cell types populating the PVN originate from different regions of the neuroepithelium. The fact that Avp-, Crh- and Trh-expressing cells differentiated at the different time points may suggest that cell diversity is determined temporally instead of spatially in the developing PVN.

Acknowledgements

This work was funded by the Canadian Institute of health Research (CIHR).

References

Arnold-Aldea, S. A. and C. L. Cepko (1996). "Dispersion patterns of clonally related cells during development of the hypothalamus." *Dev Biol* 173(1): 148-161.

Ball, S. G. (2007). "Vasopressin and disorders of water balance: the physiology and pathophysiology of vasopressin." *Ann Clin Biochem* 44(Pt 5): 417-431.

Blechman, J., N. Borodovsky, et al. (2007). "Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein Orthopedia." *Development* 134(24): 4417-4426.

Boorse, G. C. and R. J. Denver (2004). "Expression and hypophysiotropic actions of corticotropin-releasing factor in *Xenopus laevis*." *Gen Comp Endocrinol* 137(3): 272-282.

Brown, D. D. and L. Cai (2007). "Amphibian metamorphosis." *Dev Biol* 306(1): 20-33.

Brown, D. D., L. Cai, et al. (2005). "Thyroid hormone controls multiple independent programs required for limb development in *Xenopus laevis* metamorphosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35): 12455-12458.

Brown, D. D., Z. Wang, et al. (1995). "Amphibian metamorphosis: a complex program of gene expression changes controlled by the thyroid hormone." *Recent Prog Horm Res* 50: 309-315.

Caqueret, A., F. Boucher, et al. (2006). "Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus." *Dev Biol* 298(1): 95-106.

Caqueret, A., P. Coumailleau, et al. (2005). "Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo." *Dev Dyn* 233(2): 652-658.

Caqueret, A., C. Yang, et al. (2005). "Looking for trouble: a search for developmental defects of the hypothalamus." *Horm Res* 64(5): 222-230.

Denver, R. J. (1993). "Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin-releasing hormone-like peptides." *Gen Comp Endocrinol* 91(1): 38-51.

Gimpl, G. and F. Fahrenholz (2001). "The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation." *Physiol Rev* 81(2): 629-683.

- Miedlar, J. A., L. Rinaman, et al. (2007). "Oxytocin gene deletion mice overconsume palatable sucrose solution but not palatable lipid emulsions." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(3): R1063-1068.
- Mohr, E., U. Bahnsen, et al. (1988). "Expression of the vasopressin and oxytocin genes in rats occurs in mutually exclusive sets of hypothalamic neurons." *FEBS Lett* 242(1): 144-148.
- Niewkoop PD, F. J. (1994). *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin): A Systematical & Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis*. New York, Garland.
- Rogers, R. C. and D. O. Nelson (1984). "Neurons of the vagal division of the solitary nucleus activated by the paraventricular nucleus of the hypothalamus." *J Auton Nerv Syst* 10(2): 193-197.
- Saper, C. B., A. D. Loewy, et al. (1976). "Direct hypothalamo-autonomic connections." *Brain Res* 117(2): 305-312.
- Sawchenko, P. E., T. Imaki, et al. (1992). "Co-localization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus." *Ciba Found Symp* 168: 16-30; discussion 30-42.
- Sawchenko, P. E. and L. W. Swanson (1982). "Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat." *J Comp Neurol* 205(3): 260-272.
- Swanson, L. W. and H. G. Kuypers (1980). "The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods." *J Comp Neurol* 194(3): 555-570.
- Swanson, L. W. and P. E. Sawchenko (1983). "Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei." *Annu Rev Neurosci* 6: 269-324.
- Wullimann, M. F., E. Rink, et al. (2005). "Secondary neurogenesis in the brain of the African clawed frog, *Xenopus laevis*, as revealed by PCNA, Delta-1, Neurogenin-related-1, and NeuroD expression." *J Comp Neurol* 489(3): 387-402.
- Yaoita, Y. and D. D. Brown (1990). "A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis." *Genes Dev* 4(11): 1917-1924.

Table 1. List of the probes used in this study.

Probe name	NCBI accession no.	Gene length	Position in mRNA	Length
<i>Otp</i> *	XM_002940870	1849	471-926	460
<i>Sim1</i> *	XM_002932141	2327	353-1348	996
<i>Sim2</i>	NM_001085632	2283	1128-2018	891
<i>Brn2</i>	NM_001096751	1158	11-722	711
<i>Fezf2</i>	NM_001096464	1305	160-1081	922
<i>Nkx2.1</i>	NM_001085624	1044	128-891	764
<i>Trh</i>	NM_001087865	675	10-623	614
<i>Avp</i> *	XM_002936358	735	5-654	650
<i>Crh</i>	S50096	498	3-443	441

*Primer was designed in *X. tropicalis* sequence

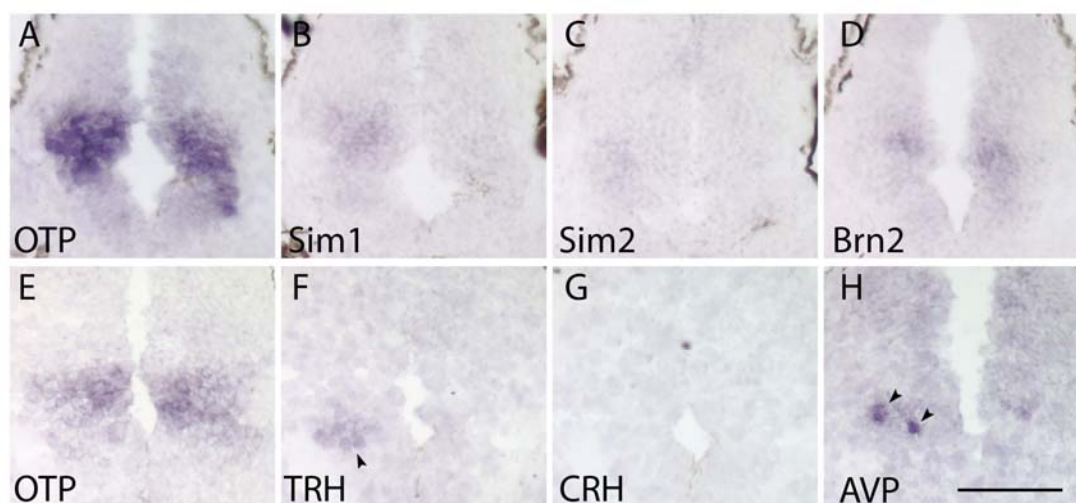


Fig. II-1. First signs of terminal differentiation. Coronal sections through the hypothalamus of wild type *Xenopus laevis* tadpoles of stages 30-33 (A-D) and 37-39 (E-H). Sections were hybridized with *Otp* (A, E), *Sim1* (B), *Sim2* (C), *Brn2* (D), *Trh* (F), *Crh* (G) and *Avp* (H) probes. (A-D) and (E-H) represent two sets of adjacent sections. Arrowheads show the appearance of the first signs of terminally differentiated cells, scale bar represents 100 μ m.

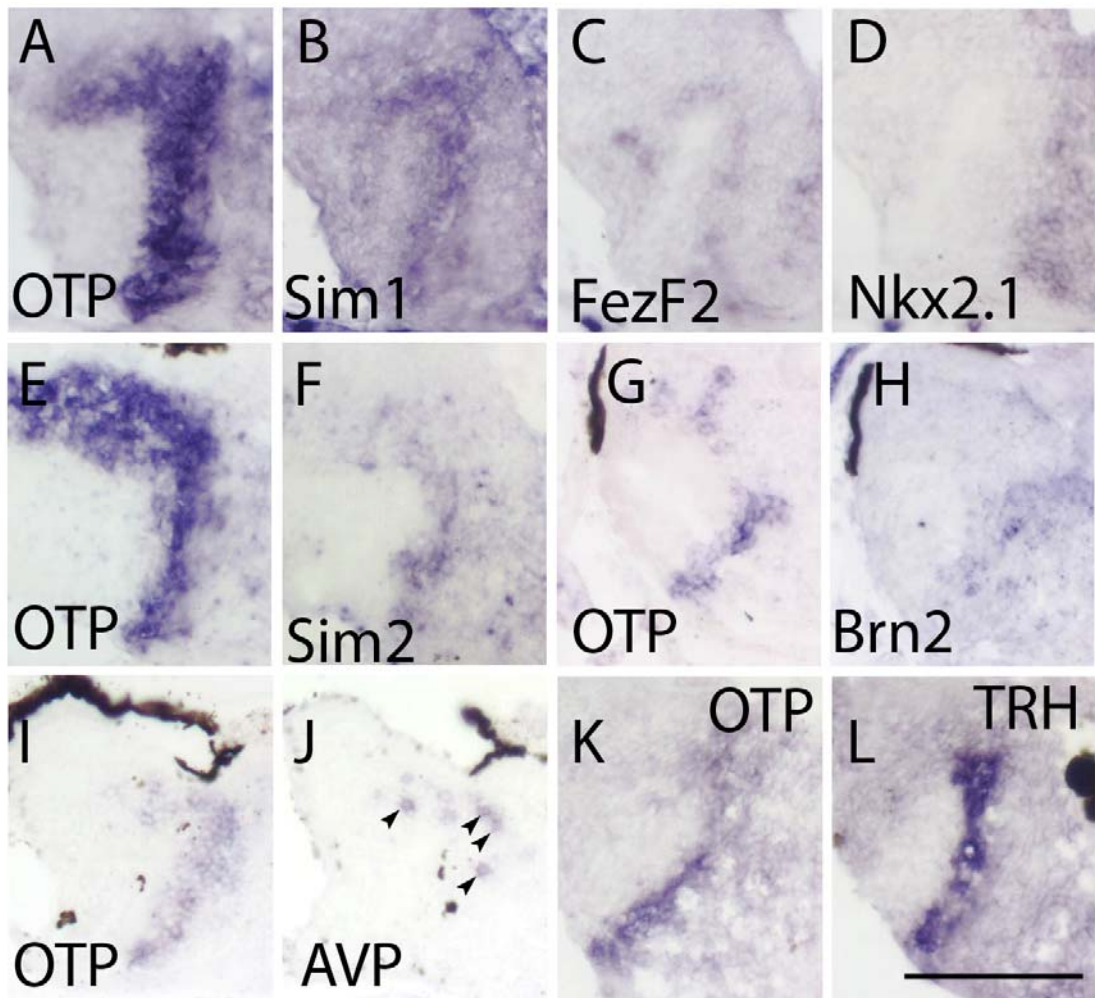


Fig. II-2. Elongation of the expression domains. Coronal sections through stage 44-46 wild type *Xenopus laevis* tadpoles were hybridized with *Otp* (A, E, G, I, K), *Sim1* (B) *Fezf2* (C), *Nkx2.1* (D), *Sim2* (F), *Brn2* (H), *Avp* (J) and *Trh* (L) probes. (A-D), (E, F), (G, H), (I, J) and (K, L) represent different sets of adjacent sections. The expression of *Otp* overlaps with the expression of all other probes (A-C, E-L), with the exception of *Nkx2.1* (D), a probe that labels the arcuate nucleus. Arrowheads points to *Avp* expressing neurons, scale bar represents 100 μ m.

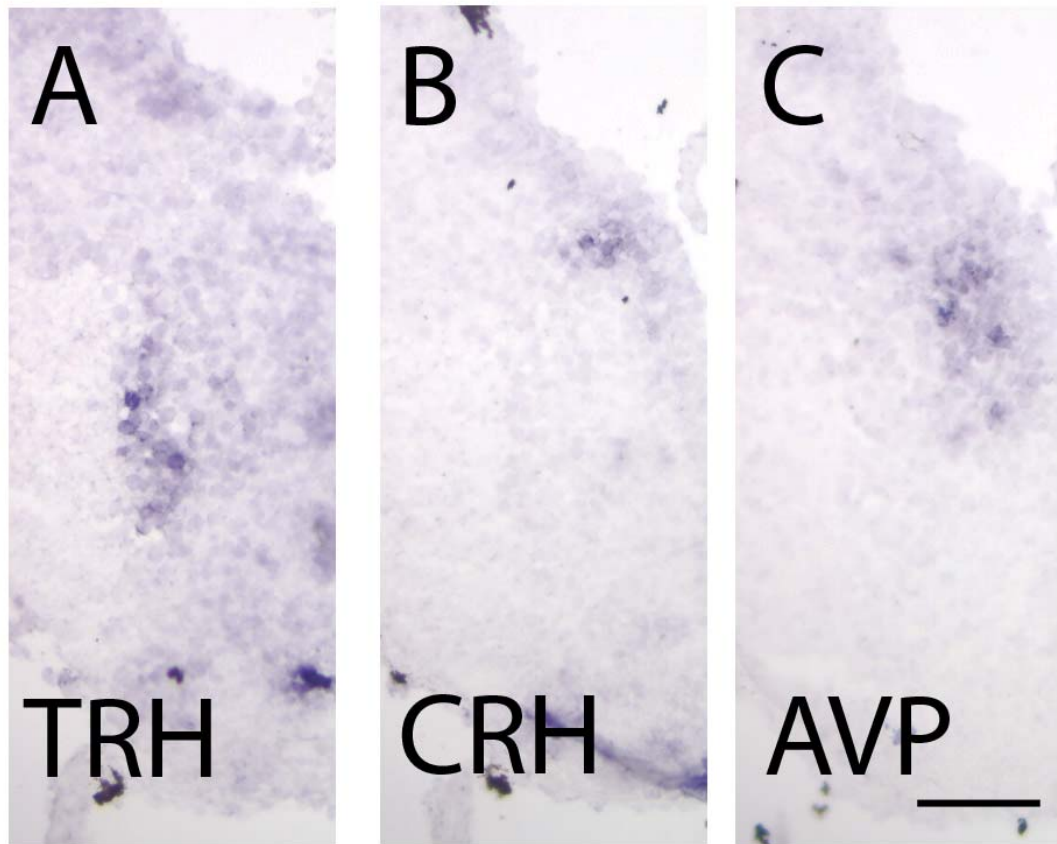


Fig. II-3. Onset of *Crh* expression. Coronal sections of stage 51 wild type *Xenopus laevis* tadpoles hybridized with either *Trh* (A), *Crh* (B) or *Avp* (C) probes. *Trh*'s (A) expression is found only in the lateral hypothalamus whereas *Crh* (B) and *Avp* (C) are found in the medial layer, (A-C) are adjacent sections. Third ventricle is to the right of each panel, scale bar represent 100 μm.

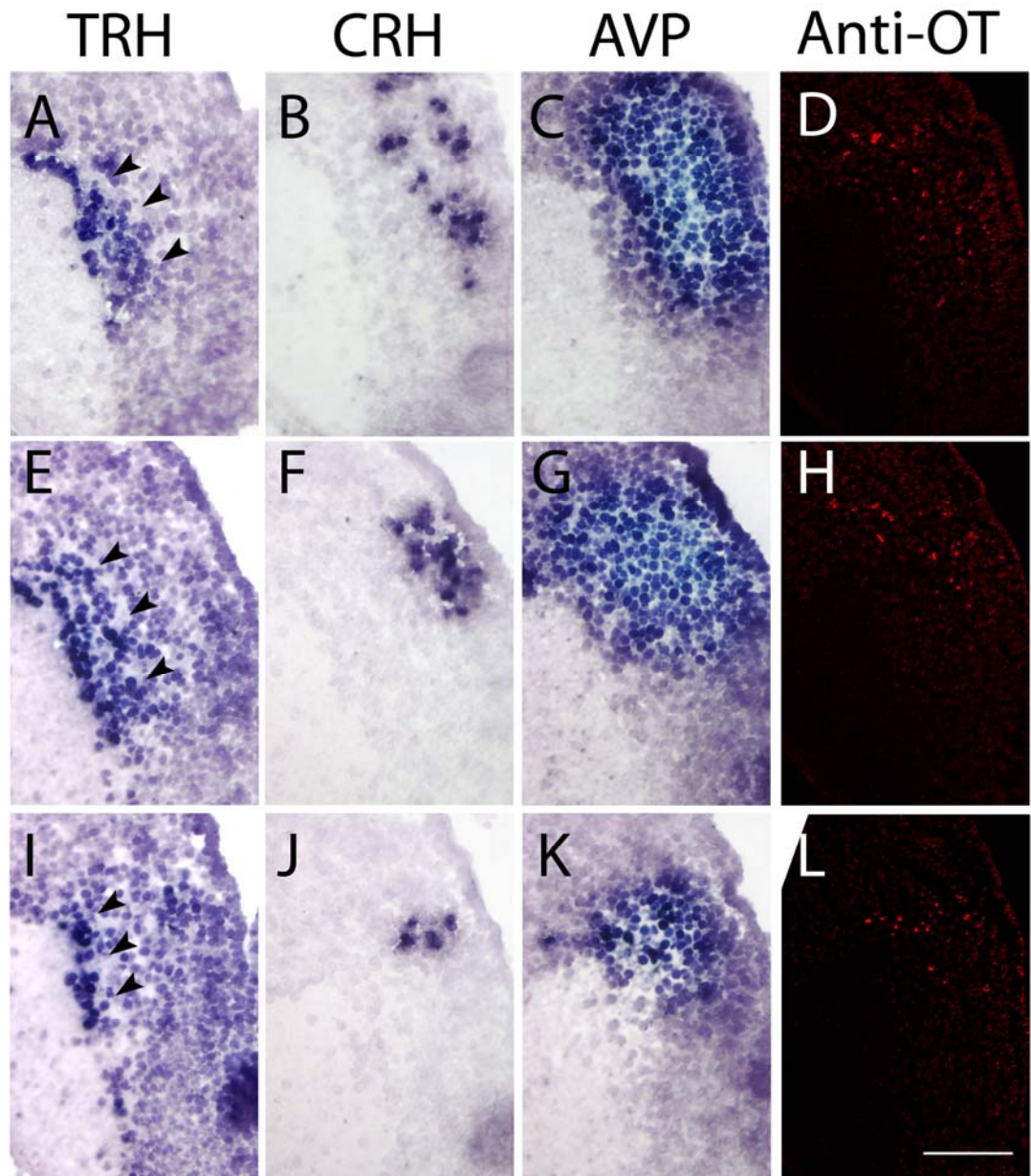


Fig. II-4. Terminal differentiation at the onset of prometamorphosis. Coronal sections of wild type prometamorphic *Xenopus laevis* hypothalamus were hybridized with *Trh* (A, E, I), *Crh* (B, F, J) and *Avp* (C, G, K) probes or stained with a fluorescent OT antibody (D, H, L). (A-D), (E-H) and (I-L) represent different sets of adjacent

sections. *Trh* (I) expression is found the lateral area of the hypothalamus, black arrowheads. Third ventricle is to the right of each panel, scale bar represents 100 μm .

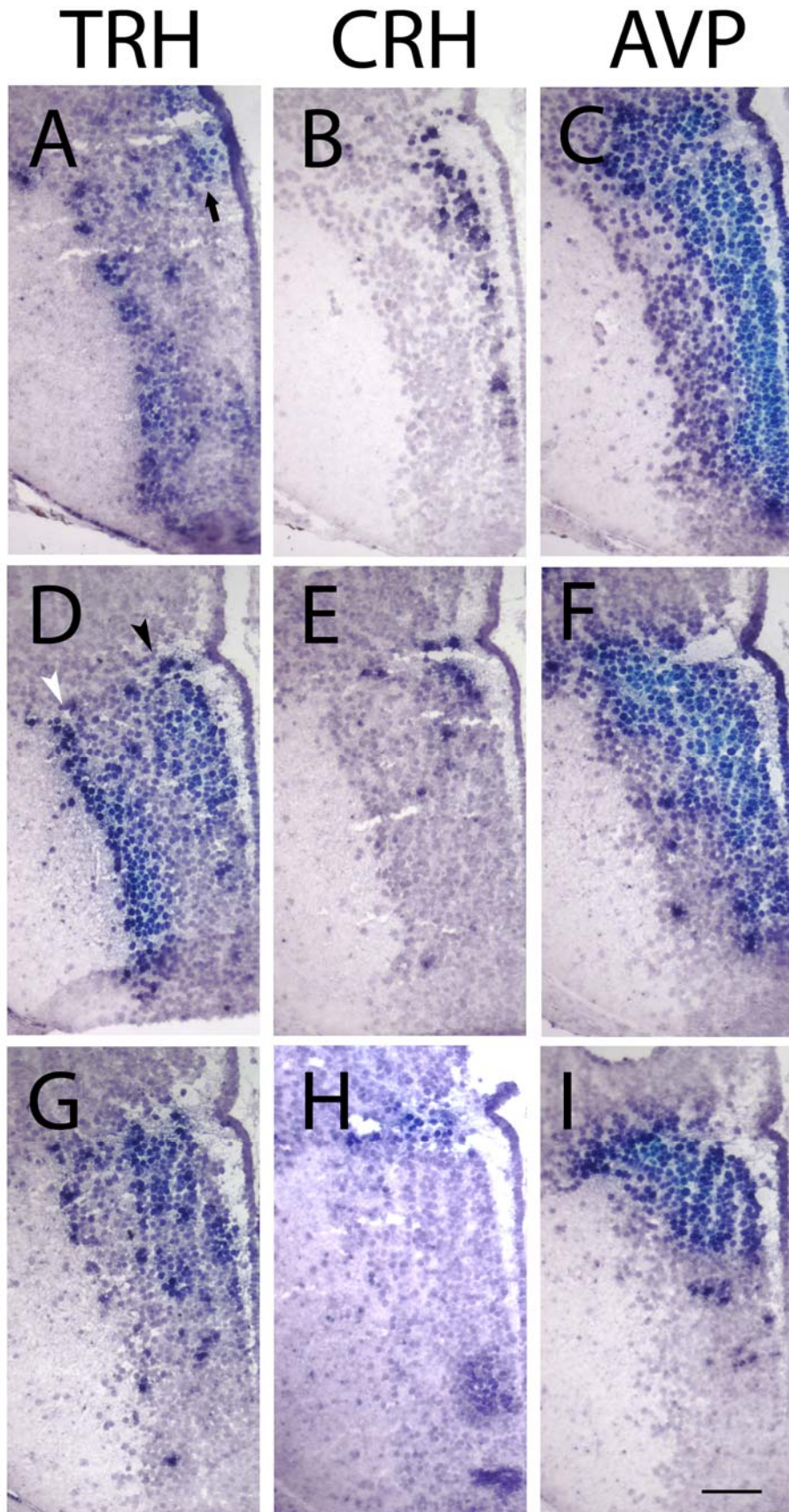


Fig. II-5. Terminal differentiation at the climax of metamorphosis. Coronal sections of stage 60 wild type *Xenopus laevis* tadpoles at the climax of metamorphosis were hybridized with either *Trh* (A, D, G), *Crh* (B, E, H) or *Avp* (C, F, I) probes, (A-C), (D-F) and (G-I) represent three sets of adjacent sections. *Trh* positive cells are detected in the medial layer of the hypothalamus, black arrow. In panel D we observe two distinct layers of *Trh* expression, in the lateral hypothalamus, white arrowhead and in the PVN, black arrowhead. *Crh* (B) and *Avp* (C) expression domains have a more elongated form than at stage 54. Third ventricle is to the right of each panel, scale bar represents 100 μm .

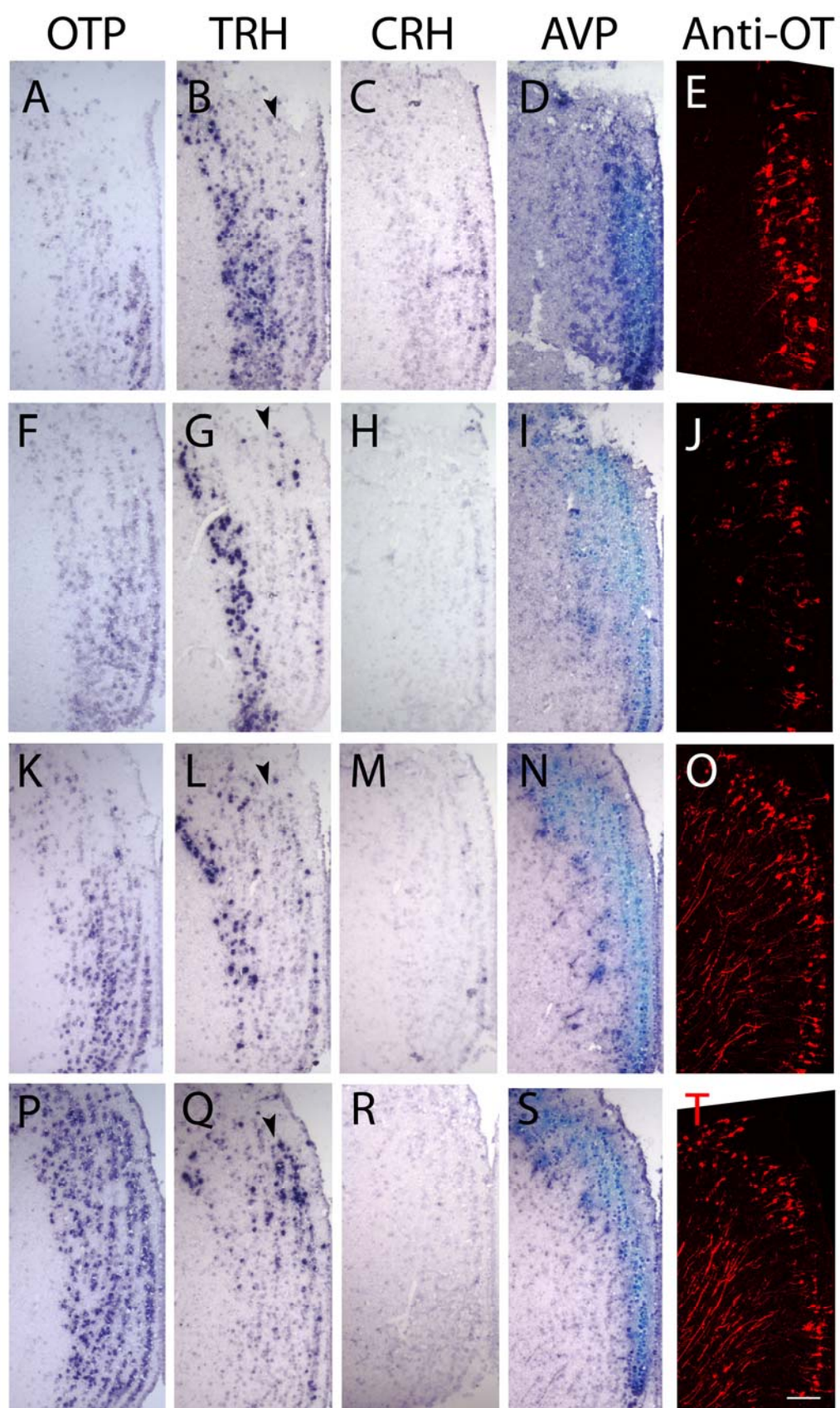


Fig. II-6. Terminal differentiation in the adult brain. Coronal sections through the wild type adult brain hypothalamus were hybridized with *Otp* (A, F, K, P), *Trh* (B, G, L, Q), *Crh* (C, H, M, R) and *Avp* (D, I, N, S) probes or stained with a fluorescent OT antibody (E, J, O, T). (A-E), (F-J), (K-O) and (P-T) represents different sets of adjacent sections. *Trh* expressing cells are found in the medial layer of the hypothalamus, black arrowheads, and are well separated from the lateral hypothalamus neurons. Neurons of the medial layer, but not the lateral layer, form strings of cells parallel to the ventricle. *Crh* expression is greatly reduced (C, H, M, R). Third ventricle is to the right of every panel, scale bar represents 100 μ m.

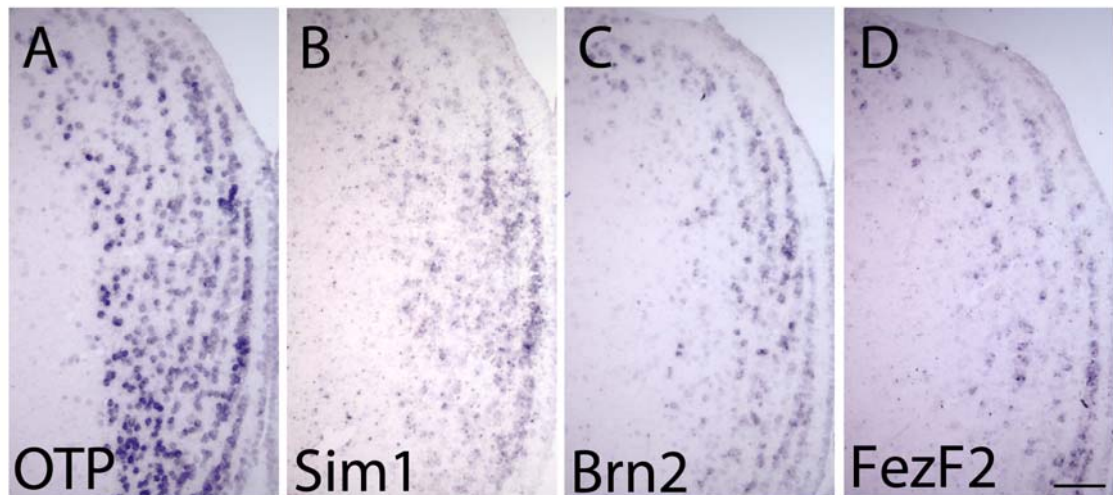


Fig. II-7. Transcription factors of the PVN in the adult brain. Adjacent coronal sections of a wild type *Xenopus laevis* adult hypothalamus were hybridized with *Otp* (A), *Sim1* (B), *Brn2* (C) and *Fezf2* (D) probe. Cells of the medial layer form strings of cells in the medial but not the lateral layer of the hypothalamus. Third ventricle is to the right of every panel, scale bar represents 100 μ m.

Chapitre III : Discussion

Conservation entre les modèles

L'étude de la cascade des facteurs de transcriptions impliqués dans le développement du PVN nous permet de comparer le développement de ce noyau chez l'amphibien à celui d'organismes plus connus comme la souris. Tous les facteurs de transcriptions de la cascade sont exprimés dans une même région de l'hypothalamus chez l'amphibien. Ceci suggère que les rôles de ces derniers sont relativement bien conservés dans le développement de l'hypothalamus amphibien. L'expression d'*Arnt2*, le partenaire de dimérisation de SIM1 et SIM2, n'a pas été étudié dans le cadre de ce projet, ce facteur de transcription est toutefois exprimé dans l'hypothalamus amphibien à partir du stade 22 (Rowatt, DePowell et al., 2003). Le *Xenopus laevis* possède les deux paralogues de ce gène soit *Arnt1* et *Arnt2* contrairement au poisson zébré qui ne possède qu'*Arnt2* (Rowatt, DePowell et al., 2003). L'hypothalamus antérieur en développement de l'amphibien est formé de deux couches d'expression, une couche plus médiane exprimant *Brn2*, *Ot*, *Avp* et *Crh*, et une couche plus latérale exprimant *Sim2* et *Trh*. Ceci peut aussi être observé chez la souris (Caqueret, Boucher et al., 2006), suggérant un certain niveau de conservation dans les processus développementaux menant à la formation de l'hypothalamus antérieur. La relation spatiale et temporelle entre les facteurs de transcription et les différents marqueurs de différenciation terminale semble aussi être préservée puisque chez les rongeurs, *Brn2* est requis pour la différenciation terminale des neurones

produisant l'OT, l'AVP et la CRH, et que *Sim2* est requis pour la différenciation de la majorité des neurones sécrétant la SS et la TRH dans l'hypothalamus. Chez le *Xenopus laevis* comme chez le poulet et la souris, les domaines d'expression des marqueurs de différenciation terminale se situent principalement dans des sous-domaines de *Sim1* et d'*Otp*. Nous estimons que le fait que tous les facteurs de transcription de la cascade impliqués dans le développement du PVN soient exprimés dans une petite région de part et d'autre du troisième ventricule suggère que ces facteurs ont un rôle chez le *Xenopus laevis* similaire à leur rôle chez la souris. La présence, dans cette même région, des différents marqueurs de différenciation terminale des neurones produisant l'AVP, l'OT, la TRH et la CRH ne fait que renforcer l'idée que les processus développementaux menant à la formation du PVN sont conservés entre ces deux organismes.

Par contre, il existe des différences en ce qui a trait à certains aspects du développement de l'hypothalamus entre ces deux vertébrés. Un de ces aspects est l'ordre d'apparition des différents neurones du PVN. Chez la souris, les neurones du PVN complètent leur différenciation terminale entre E13.5 et E15.5, les neurones produisant la CRH apparaissent en premier à 13.5, TRH à 14.5 et l'AVP à 15.5 (Seasholtz, Bourbonais et al., 1991; Hyodo, Yamada et al., 1992; Caqueret, Boucher et al., 2006). Chez le *Xenopus*, les neurones produisant l'AVP apparaissent les premiers entre les stades 37 et 39, les neurones exprimant la *Trh* apparaissent presque immédiatement après, au stade 37, nous ne détectons la *Crh* dans le PVN qu'après le stade 50 (Figure III-1). L'ordre de la différenciation terminale des différents neuropeptides est donc complètement inversé par rapport aux rongeurs.

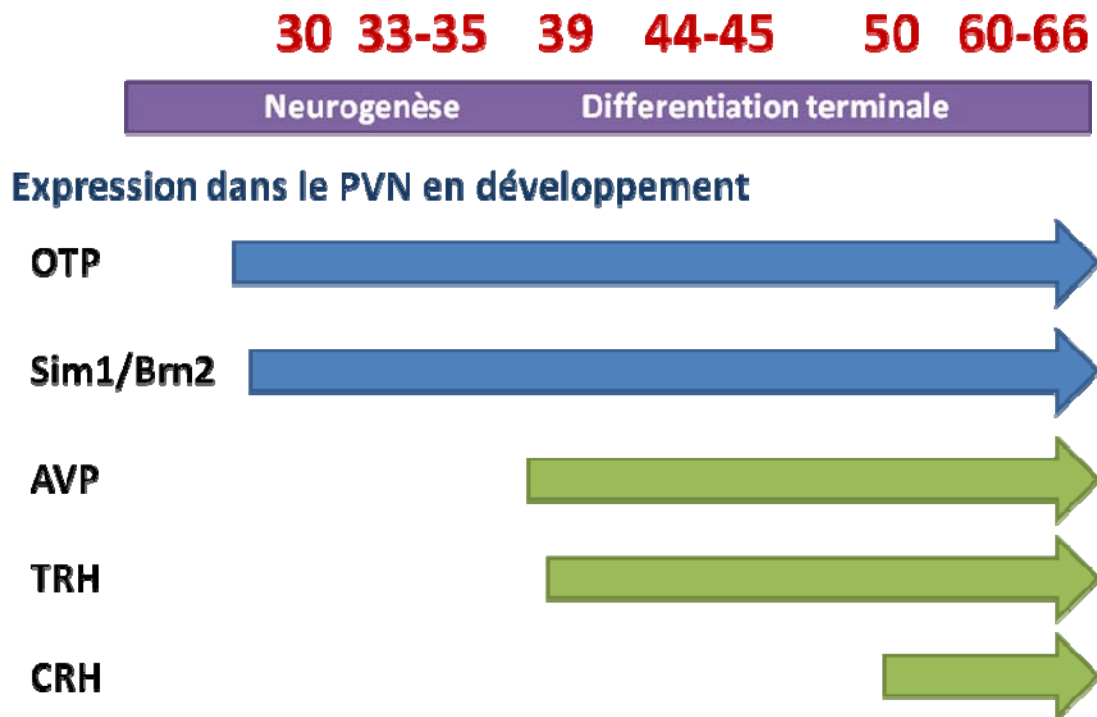


Figure III-1. Neurogénèse et différenciation terminale des neurones du PVN amphibien. La neurogénèse dans l'hypothalamus prospectif de l'amphibien commence avant le stade 30 tout comme l'expression d'OTP, Sim1 et Brn2. Les neurones sécrétant l'AVP commencent leur différenciation terminale au stade 37 tout juste avant les neurones TRH. Les premiers signes de différenciation terminale des neurones CRH apparaissent vers les stades 49 ou 50.

Une autre différence marquante entre l'amphibien et la souris est la migration des neurones différenciés de l'hypothalamus. Chez la souris, les neurones du PVN migrent de façon radiale et se regroupent ensuite en domaines bien définis selon leur identité. Chez le *Xenopus laevis*, les neurones matures vont rapidement adopter un patron de migration tangentiel et migrer ventralement, ce qui conduit à l'étirement

des différents domaines d'expression (Figure III-2). Au stade adulte, cette migration tangentielle produit des chapelets, ou des colonnes de cellules bien alignées dans la couche médiane de l'hypothalamus, ce que nous n'observons pas chez les mammifères. L'hypothalamus des mammifères est organisé en plusieurs noyaux compacts séparés par des régions moins bien définies. Chez l'amphibien, ces régions sont plus larges et s'étendent le long du troisième ventricule, l'hypothalamus amphibien est donc plus compact que celui de la souris.

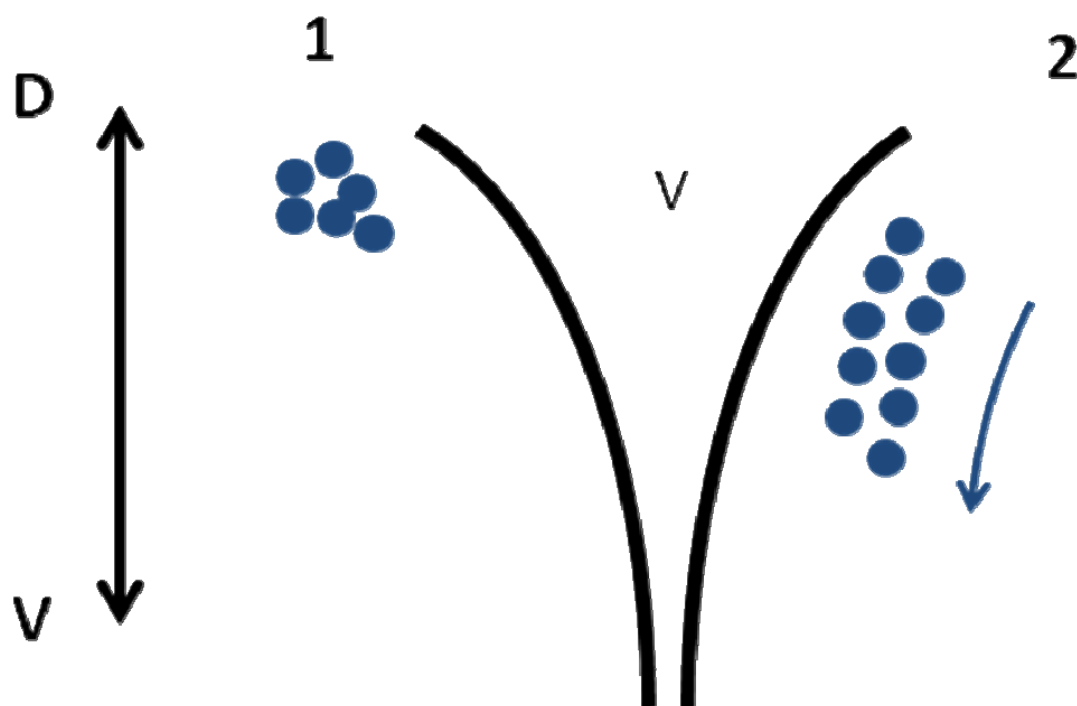


Figure III-2. Étalement des domaines d'expression des neuropeptides. Les domaines d'expression des différents neuropeptides ont d'abord une apparence plutôt globulaire (1), ces neurones vont ensuite adopter un patron de migration tangentielle et migrer

ventralement le long du ventricule, ce qui a pour effet d'allonger les domaines d'expressions (2). V : ventricule.

Développement de l'hypothalamus durant la métamorphose

Comme plusieurs groupes ont pu le démontrer, l'hypothalamus, et plus particulièrement le PVN, est un régulateur majeur de la métamorphose chez les amphibiens. Ceci a été démontré dans plusieurs amphibiens soit par l'ablation de l'hypothalamus soit par la destruction des connexions entre l'hypothalamus et l'hypophyse (Etkin and Sussman, 1961; Hanaoka, 1967; Goos, 1969). La métamorphose chez l'amphibien est divisée en trois phases, la prémétamorphose, la prométamorphose et le climax. La sécrétion de HT, principale hormone régulant le processus métamorphique, ne commencent qu'à la prométamorphose avec la maturation de la glande thyroïdienne au stade 54. Cette hormone est sécrétée, non pas en réponse à stimulation de l'hypophyse par la TRH mais par la CRH (Miranda, Affanni et al., 2000; Boorse and Denver, 2004). La maturation des neurones hypophysiotropiques de l'hypothalamus, plus particulièrement les neurones produisant la CRH, est une composante essentielle à la métamorphose. Dans le PVN, nous observons l'apparition des premiers neurones différenciés sécrétant la CRH au stade 51, soit quelques jours avant la prométamorphose et une augmentation marquée du nombre des cellules différenciées à la prométamorphose et au climax. Les niveaux de HT circulant au climax de la métamorphose sont les plus élevés au cours du développement et diminuent significativement par la suite, cette diminution est accompagnée par une baisse des niveaux d'expression de la *Crh*. En effet, les niveaux

d'expression de la CRH dans le PVN sont grandement diminués au stade adulte, cette diminution est le résultat de deux phénomènes physiologiques. Premièrement, l'expression de *Crh* diminue du fait que la métamorphose est terminée et les hauts niveaux de HT circulants ne sont plus nécessaires. Deuxièmement, la TRH assume son rôle de facteur de relâche de la TSH chez l'adulte. Cette synchronisation entre les évènements de la métamorphose et la différenciation terminale des neurones sécrétant la CRH renforce l'hypothèse voulant que ce neuropeptide soit le facteur de relâche de la TSH et que le signal qui initie la métamorphose origine de la région préoptique, homologue du PVN chez l'amphibien selon Denver R. J. (Boorse and Denver, 2004). Le PVN est un intégrateur de plusieurs signaux en provenance du cerveau et de la périphérie. Il serait donc intéressant de vérifier si ce noyau sécrète la CRH en réponse à un signal quelconque, ou si la métamorphose est une réponse naturelle au développement du système hypothalamo-hypophysaire.

L'utilisation des morpholinos

Certains travaux récents du laboratoire portent sur l'identification de facteurs qui agissent en aval ou en amont de la cascade de facteurs de transcription décrite chez la souris. En employant deux approches d'études du transcriptome, nous avons identifié un grand nombre de facteurs de transcription qui pourraient agir le long de cette cascade. La perte de fonction par injection de morpholinos dans le *Xenopus* se présente donc comme un moyen rapide d'étudier la fonction de ces différents facteurs de transcription candidats. Les morpholinos sont des analogues de nucléotides utilisés pour la perte de fonction transitoire d'un gène en inhibant la traduction de son ARN

messenger en protéine. Ces oligonucléotides de 18-25 mers sont généralement dirigés vers la région 5' non-traduite et mènent à la dégradation de l'ARN messenger ciblé et du morpholino. Des études comparant l'effet des morpholinos au phénotype des mutants naturels démontre une bonne reproduction du phénotype (Heasman, 2002). Le groupement ribose des nucléotides composant ces oligos est remplacé par un groupement morpholino. Ils ne sont donc pas sensible à la dégradation par la RNase H et donc plus stable que les ARN interférents. Ces oligos perdrons leur efficacité principalement par dilution suite à plusieurs divisions cellulaires. En injectant un morpholino synthétisé pour réprimer la traduction d'un gène rapporteur *Gfp* dans les deux cellules d'embryons transgéniques de xéopus, certains ont pu empêcher la production de ce rapporteur jusqu'au stade 43, soit pour environ une semaine après la fécondation (Nutt, Bronchain et al., 2001).

Nous pouvons détecter les premiers signes de différenciation terminale de neurones de l'hypothalamus chez le *Xenopus laevis* aux stades 37-39, soit deux à trois jours post fécondation. De plus, l'expression des facteurs de transcriptions d'intérêt peut être détectée aussi tôt qu'au stade 30, soit un jour à 1 jour et demi post fécondation. La durée d'action des morpholinos est donc suffisamment longue pour les études de pertes de fonctions que nous désirons entreprendre sur ce modèle. Des morpholinos dirigés contre les facteurs de transcription connus de la cascade auraient donc le potentiel d'affecter le développement des neurones du PVN. Il faut toutefois souligner qu'il est possible qu'une perturbation du développement du PVN chez l'amphibien entraîne une létalité précoce, pouvant même survenir aussi tôt qu'au stade de la métamorphose. En injectant des morpholinos contre les différents facteurs

de transcription candidats identifiés par les approches de micropuces, nous pouvons espérer identifier de nouveaux membres faisant partie de cette cascade de quatre façons. Premièrement, un gène dont l'inhibition empêcherait la différenciation terminale d'une ou plusieurs lignées neuronales du PVN sans affecter l'expression de *Sim1*, *Otp*, *Sim2* et *Brn2*, agirait en aval de ces facteurs. Deuxièmement, un gène dont la répression n'affecterait pas l'expression de *Sim1* et *Otp*, mais inhiberait celle de *Sim2* ou *Brn2* agirait donc en amont de ces derniers. Une troisième possibilité est qu'un morpholino dirigé contre un de nos facteurs de transcription candidats bloque l'expression de *Sim1* ou *Otp*, et les gènes qui sont en aval de ces derniers. Ce facteur de transcription se placerait alors à la tête de la cascade. La quatrième possibilité est qu'on ne remarque aucun effet sur l'expression des différents gènes étudiés et aucun effet sur la différenciation. Étant donné que l'hypothalamus est une composante clé de la métamorphose, on ne peut exclure un effet à long terme du blocage d'un facteur de la cascade sur la métamorphose. Ces effets peuvent être un délai ou un blocage de la métamorphose.

Avantages du modèle

Le *Xenopus laevis* n'est pas le seul modèle animal qui aurait pu être utilisé pour des études de pertes de fonction rapide pour le criblage de nombreux gènes candidats. Plusieurs modèles animaux se prêtent bien aux injections de morpholinos et à divers ARN interférents et partagent plusieurs avantages avec le *Xenopus*, le poisson zébré est un de ces modèles que nous avons considéré. Le poisson zébré, tout comme le *Xenopus*, est facile à maintenir et produit de grandes quantités d'embryons

qui sont accessible dès la fertilisation pour injection, plusieurs études sur différents facteurs de transcription de la cascade ont déjà été étudiés dans ce modèle dans le cadre de la biologie du développement comme OTP, SIM1 et ARNT2 (Eaton and Glasgow, 2006; Blechman, Borodovsky et al., 2007; Hill, Heiden et al., 2009). Un autre avantage est que le génome de ce poisson est relativement bien connu, le poisson zébré est donc un organisme relativement mieux caractérisé que le *Xenopus*, surtout au niveau du cerveau.

Plusieurs raisons ont motivé notre choix de se tourner vers le *Xenopus laevis* pour notre étude de criblage, la première étant la grosseur des oocytes amphibiens, la grande taille des œufs facilite grandement les injections et permettent l'injection d'un plus grand volume, donc une plus grande quantité de morpholinos. Les embryons, et par la suite les têtards sont plus gros que les embryons du poisson zébré, cette différence de taille nous donne un avantage majeur pour l'étude morphologiques des patrons d'expressions des différents gènes de notre étude. La largeur du SNC nous permet d'effectuer des coupes coronales adjacentes sans pour autant perdre trop de précision, puisque l'hypothalamus n'est qu'une petite région d'un cerveau relativement petit. Selon le stade étudié nous pouvons effectuer de trois à cinq coupes adjacentes, ce qui facilite la comparaison des domaines d'expressions de plusieurs gènes simultanément sans avoir recours à des techniques de double in situ, qui requièrent plusieurs types de nucléotides marqués et souvent plusieurs révélations, rendent plus difficile de comparer les niveaux d'expressions. D'autres avantages de ce modèle animal viennent du fait que peu de choses sont connues sur le développement de son cerveau, des études sur cet organisme permettront peut être de

mieux comprendre certains aspects du développement de l'hypothalamus qui peuvent parfois être plus compliqués chez les mammifères. Un autre avantage provient du fait que le xénope passe d'un stade exclusivement aquatique à un stade amphibien, cette métamorphose implique des changements dans l'ensemble des organes de l'animal, ce qui inclus le cerveau. Certaines études associent l'hypothalamus à la métamorphose (Etkin and Sussman, 1961; Hanaoka, 1967; Goos, 1969), il serait donc intéressant d'étudier l'implication de l'hypothalamus dans la métamorphose et d'étudier les changements ou le remodelage de cette structure durant la métamorphose.

Conclusion

L'étude des différents gènes de la cascade des facteurs de transcription nous a permis de mieux comprendre le développement de l'hypothalamus et du PVN chez l'amphibien, ces travaux ont jeté les bases pour des études plus approfondies sur la neurogénèse et les différentes formes de migration des neurones différenciés de cette structure. La caractérisation du développement de l'hypothalamus amphibien nous a permis de déterminer que le développement de cette structure est suffisamment conservé entre l'amphibien et la souris, en ce qui concerne la relation entre les différents facteurs de transcriptions et les marqueurs de différenciations terminaux, ce qui nous permettra d'utiliser ce modèle dans le cadre d'une étude de perte de fonction rapide. L'étude de l'hypothalamus sur ce modèle nous a aussi permis de lier les événements de la différenciation des neurones hypophysiotopiques produisant la

CRH au début de la métamorphose et aux niveaux de TH circulant, selon la littérature.

Bibliographie

Aarde, S. M. and J. D. Jentsch (2006). "Haploinsufficiency of the arginine-vasopressin gene is associated with poor spatial working memory performance in rats." *Horm Behav* 49(4): 501-508.

Acampora, D., M. P. Postiglione, et al. (1999). "Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the *Orthopedia* gene." *Genes Dev* 13(21): 2787-2800.

Aguilar-Valles, A., E. Sanchez, et al. (2007). "The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze." *Neurochem Int* 50(2): 404-417.

Ahituv, N., N. Kavaslar, et al. (2007). "Medical sequencing at the extremes of human body mass." *Am J Hum Genet* 80(4): 779-791.

Allen, B. M. (1916). "The results of extirpation of the anterior lobe of the hypophysis and of the thyroid of *Rana pipiens* larvae." *Science* 44(1143): 755-758.

Altman, J. and S. A. Bayer (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(4 Pt 2): 973-993.

Arborelius, L., M. J. Owens, et al. (1999). "The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders." *J Endocrinol* 160(1): 1-12.

Argiolas, A. and M. R. Melis (2004). "The role of oxytocin and the paraventricular nucleus in the sexual behaviour of male mammals." *Physiol Behav* 83(2): 309-317.

Arimura, A. and A. V. Schally (1976). "Increase in basal and thyrotropin-releasing hormone (TRH)-stimulated secretion of thyrotropin (TSH) by passive immunization with antiserum to somatostatin in rats." *Endocrinology* 98(4): 1069-1072.

Arnold-Aldea, S. A. and C. L. Cepko (1996). "Dispersion patterns of clonally related cells during development of the hypothalamus." *Dev Biol* 173(1): 148-161.

Bhattacharai, J. P., A. Kaszas, et al. (2010). "Somatostatin inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons in female and male mice." *Endocrinology* 151(7): 3258-3266.

Bielsky, I. F., S. B. Hu, et al. (2005). "The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study." *Neuron* 47(4): 503-513.

Blechman, J., N. Borodovsky, et al. (2007). "Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein Orthopedia." *Development* 134(24): 4417-4426.

Blevins, J. E., M. W. Schwartz, et al. (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(1): R87-96.

Boorse, G. C. and R. J. Denver (2004). "Expression and hypophysiotropic actions of corticotropin-releasing factor in *Xenopus laevis*." *Gen Comp Endocrinol* 137(3): 272-282.

Brown, D. D. and L. Cai (2007). "Amphibian metamorphosis." *Dev Biol* 306(1): 20-33.

Brown, D. D., L. Cai, et al. (2005). "Thyroid hormone controls multiple independent programs required for limb development in *Xenopus laevis* metamorphosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35): 12455-12458.

Camerino, C. (2009). "Low sympathetic tone and obese phenotype in oxytocin-deficient mice." *Obesity (Silver Spring)* 17(5): 980-984.

Caqueret, A., F. Boucher, et al. (2006). "Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus." *Dev Biol* 298(1): 95-106.

Caqueret, A., P. Coumailleau, et al. (2005). "Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo." *Dev Dyn* 233(2): 652-658.

Caqueret, A., C. Yang, et al. (2005). "Looking for trouble: a search for developmental defects of the hypothalamus." *Horm Res* 64(5): 222-230.

Chen, Q. and H. L. Pan (2006). "Regulation of synaptic input to hypothalamic presympathetic neurons by GABA(B) receptors." *Neuroscience* 142(2): 595-606.

Chrousos, G. P. (1995). "The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation." *N Engl J Med* 332(20): 1351-1362.

Condes-Lara, M., G. Rojas-Piloni, et al. (2009). "Paraventricular hypothalamic oxytocinergic cells responding to noxious stimulation and projecting to the spinal dorsal horn represent a homeostatic analgesic mechanism." *Eur J Neurosci* 30(6): 1056-1063.

Cunningham, E. T., Jr. and P. E. Sawchenko (1988). "Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus." *J Comp Neurol* 274(1): 60-76.

Das, B., R. A. Heimeier, et al. (2009). "Identification of direct thyroid hormone response genes reveals the earliest gene regulation programs during frog metamorphosis." *J Biol Chem* 284(49): 34167-34178.

DeLaTorre, S., G. Rojas-Piloni, et al. (2009). "Paraventricular oxytocinergic hypothalamic prevention or interruption of long-term potentiation in dorsal horn nociceptive neurons: electrophysiological and behavioral evidence." *Pain* 144(3): 320-328.

Denver R. J., G. K. A., Boorse G. C. (2002). "Endocrinology of Complex Lifecycles: Amphibians." *Hormones, Brain and Behavior*: 469–513.

Denver, R. J. (1993). "Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin-releasing hormone-like peptides." *Gen Comp Endocrinol* 91(1): 38-51.

Eaton, J. L. and E. Glasgow (2006). "The zebrafish bHLH PAS transcriptional regulator, single-minded 1 (sim1), is required for isotocin cell development." *Dev Dyn* 235(8): 2071-2082.

Egashira, N., A. Tanoue, et al. (2004). "V1a receptor knockout mice exhibit impairment of spatial memory in an eight-arm radial maze." *Neurosci Lett* 356(3): 195-198.

Elias, C. F., C. Aschkenasi, et al. (1999). "Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area." *Neuron* 23(4): 775-786.

Etkin, W. and W. Sussman (1961). "Hypothalamo-pituitary relations in metamorphosis of *Ambystoma*." *Gen Comp Endocrinol* 1: 70-79.

Fekete, C., P. S. Singru, et al. (2006). "Differential effects of central leptin, insulin, or glucose administration during fasting on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and feeding-related neurons in the arcuate nucleus." *Endocrinology* 147(1): 520-529.

Furlow, J. D. and E. S. Neff (2006). "A developmental switch induced by thyroid hormone: *Xenopus laevis* metamorphosis." *Trends Endocrinol Metab* 17(2): 40-47.

Gobrogge, K. L., Y. Liu, et al. (2007). "Anterior hypothalamic neural activation and neurochemical associations with aggression in pair-bonded male prairie voles." *J Comp Neurol* 502(6): 1109-1122.

Goos, H. J. (1969). "Hypothalamic neurosecretion and metamorphosis in *Xenopus laevis*. IV. The effect of extirpation of the presumed TRF cells and of a subsequent PTU treatment." *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 97(3): 449-458.

Goshu, E., H. Jin, et al. (2002). "Sim2 mutants have developmental defects not overlapping with those of Sim1 mutants." *Mol Cell Biol* 22(12): 4147-4157.

Goshu, E., H. Jin, et al. (2004). "Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus." *Mol Endocrinol* 18(5): 1251-1262.

Griffond, B., P. Y. Risold, et al. (1999). "Insulin-induced hypoglycemia increases preprohypocretin (orexin) mRNA in the rat lateral hypothalamic area." *Neurosci Lett* 262(2): 77-80.

Gudernatsch, J. F. (1912). "Feeding experiments on tadpoles: I. The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. A contribution to the knowledge of organs with internal secretion." *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* 23(3): 457-483.

Guo, F., K. Bakal, et al. (2004). "Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo." *Endocrinology* 145(5): 2221-2227.

Gurdon, J. B. and N. Hopwood (2000). "The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes." *Int J Dev Biol* 44(1): 43-50.

Han, F., H. Ozawa, et al. (2007). "Changes in the expression of corticotrophin-releasing hormone, mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus induced by fornix transection and adrenalectomy." *J Neuroendocrinol* 19(4): 229-238.

Hanaoka, Y. (1967). "The effects of posterior hypothalactomy upon the growth and metamorphosis of the tadpole of *Rana pipiens*." *Gen Comp Endocrinol* 8(3): 417-431.

Hao, L., M. Li, et al. (2010). "Reduced somatostatin in hypothalamus of young male mouse increases local but not circulatory GH." *Neurochem Res* 35(1): 143-151.

Harris, A. R., D. Christianson, et al. (1978). "The physiological role of thyrotropin-releasing hormone in the regulation of thyroid-stimulating hormone and prolactin secretion in the rat." *J Clin Invest* 61(2): 441-448.

Hauge-Evans, A. C., A. J. King, et al. (2009). "Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function." *Diabetes* 58(2): 403-411.

Heasman, J. (2002). "Morpholino oligos: making sense of antisense?" *Dev Biol* 243(2): 209-214.

Hill, A. J., T. C. Heiden, et al. (2009). "Potential roles of *Arnt2* in zebrafish larval development." *Zebrafish* 6(1): 79-91.

Holder, J. L., Jr., N. F. Butte, et al. (2000). "Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene." *Hum Mol Genet* 9(1): 101-108.

Holland, P. W. and T. Takahashi (2005). "The evolution of homeobox genes: Implications for the study of brain development." *Brain Res Bull* 66(4-6): 484-490.

Holmes, C. L., D. W. Landry, et al. (2004). "Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology." *Crit Care* 8(1): 15-23.

Holsboer, F. and M. Ising (2008). "Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists." *Eur J Pharmacol* 583(2-3): 350-357.

Hosoya, T., Y. Oda, et al. (2001). "Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice." *Genes Cells* 6(4): 361-374.

Huang, Z. J., I. Edery, et al. (1993). "PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors." *Nature* 364(6434): 259-262.

Hyodo, S., C. Yamada, et al. (1992). "Expression of provasopressin gene during ontogeny in the hypothalamus of developing mice." *Neuroscience* 46(1): 241-250.

Ifft, J. D. (1972). "An autoradiographic study of the time of final division of neurons in rat hypothalamic nuclei." *J Comp Neurol* 144(2): 193-204.

Ikeda, K., Y. Iwasaki, et al. (1998). "JTP-2942, a novel thyrotropin-releasing hormone analogue, protects against spinal motor neuron degeneration in the wobbler mouse." *Neurosci Lett* 250(1): 9-12.

Inyushkin, A. N., H. O. Orlans, et al. (2009). "Secretory cells of the supraoptic nucleus have central as well as neurohypophysial projections." *J Anat* 215(4): 425-434.

Jhanwar-Uniyal, M., B. Beck, et al. (1993). "Neuropeptide Y projection from arcuate nucleus to parvocellular division of paraventricular nucleus: specific relation to the ingestion of carbohydrate." *Brain Res* 631(1): 97-106.

Kalsbeek, A., S. La Fleur, et al. (2004). "Suprachiasmatic GABAergic inputs to the paraventricular nucleus control plasma glucose concentrations in the rat via sympathetic innervation of the liver." *J Neurosci* 24(35): 7604-7613.

Karalis, K., H. Sano, et al. (1991). "Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo." *Science* 254(5030): 421-423.

- Karim, M. A. and J. C. Sloper (1980). "Histogenesis of the supraoptic and paraventricular neurosecretory cells of the mouse hypothalamus." *J Anat* 130(Pt 2): 341-347.
- Kippin, T. E., V. Sotiropoulos, et al. (2004). "Opposing roles of the nucleus accumbens and anterior lateral hypothalamic area in the control of sexual behaviour in the male rat." *Eur J Neurosci* 19(3): 698-704.
- Kohno, D., S. Suyama, et al. (2008). "Leptin transiently antagonizes ghrelin and long-lastingly orexin in regulation of Ca²⁺ signaling in neuropeptide Y neurons of the arcuate nucleus." *World J Gastroenterol* 14(41): 6347-6354.
- Koob, G. F. and S. C. Heinrichs (1999). "A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors." *Brain Res* 848(1-2): 141-152.
- Kublaoui, B. M., T. Gemelli, et al. (2008). "Oxytocin deficiency mediates hyperphagic obesity of Sim1 haploinsufficient mice." *Mol Endocrinol* 22(7): 1723-1734.
- Legradi, G. and R. M. Lechan (1998). "The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus." *Endocrinology* 139(7): 3262-3270.
- Legradi, G. and R. M. Lechan (1999). "Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus." *Endocrinology* 140(8): 3643-3652.
- Li, P., X. He, et al. (1993). "Spacing and orientation of bipartite DNA-binding motifs as potential functional determinants for POU domain factors." *Genes Dev* 7(12B): 2483-2496.
- Li, X. F., J. S. Kinsey-Jones, et al. (2009). "Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat." *PLoS One* 4(12): e8334.
- Lorrain, D. S., L. Matuszewich, et al. (1997). "Extracellular serotonin in the lateral hypothalamic area is increased during the postejaculatory interval and impairs copulation in male rats." *J Neurosci* 17(23): 9361-9366.
- Lu, L., D. Liu, et al. (2000). "Differential roles of corticotropin-releasing factor receptor subtypes 1 and 2 in opiate withdrawal and in relapse to opiate dependence." *Eur J Neurosci* 12(12): 4398-4404.
- Mallo, M., D. M. Wellik, et al. (2010). "Hox genes and regional patterning of the vertebrate body plan." *Dev Biol* 344(1): 7-15.

Markakis, E. A. (2002). "Development of the neuroendocrine hypothalamus." *Front Neuroendocrinol* 23(3): 257-291.

Meyre, D., C. Lecoeur, et al. (2004). "A genome-wide scan for childhood obesity-associated traits in French families shows significant linkage on chromosome 6q22.31-q23.2." *Diabetes* 53(3): 803-811.

Michaud, J. L., F. Boucher, et al. (2001). "Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus." *Hum Mol Genet* 10(14): 1465-1473.

Michaud, J. L., C. DeRossi, et al. (2000). "ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus." *Mech Dev* 90(2): 253-261.

Michaud, J. L., T. Rosenquist, et al. (1998). "Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1." *Genes Dev* 12(20): 3264-3275.

Miranda, L. A., J. M. Affanni, et al. (2000). "Corticotropin-releasing factor accelerates metamorphosis in *Bufo arenarum*: effect on pituitary ACTH and TSH cells." *J Exp Zool* 286(5): 473-480.

Morton, G. J., D. E. Cummings, et al. (2006). "Central nervous system control of food intake and body weight." *Nature* 443(7109): 289-295.

Morvan-Dubois, G., B. A. Demeneix, et al. (2008). "Xenopus laevis as a model for studying thyroid hormone signalling: from development to metamorphosis." *Mol Cell Endocrinol* 293(1-2): 71-79.

Nakai, S., H. Kawano, et al. (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(24): 3109-3121.

Nambu, J. R., R. G. Franks, et al. (1990). "The single-minded gene of *Drosophila* is required for the expression of genes important for the development of CNS midline cells." *Cell* 63(1): 63-75.

Nemeroff, C. B., E. Widerlov, et al. (1984). "Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients." *Science* 226(4680): 1342-1344.

Nielsen, S., C. L. Chou, et al. (1995). "Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(4): 1013-1017.

Niewkoop PD, F. J. (1994). *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin): A Systematical & Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the End of Metamorphosis*. New York, Garland.

Nutt, S. L., O. J. Bronchain, et al. (2001). "Comparison of morpholino based translational inhibition during the development of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*." *Genesis* 30(3): 110-113.

Owens, M. J. and C. B. Nemeroff (1991). "Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor." *Pharmacol Rev* 43(4): 425-473.

Parmentier, R., S. Kolbaev, et al. (2009). "Excitation of histaminergic tuberomamillary neurons by thyrotropin-releasing hormone." *J Neurosci* 29(14): 4471-4483.

Perello, M., R. C. Stuart, et al. (2007). "Differential effects of fasting and leptin on proopiomelanocortin peptides in the arcuate nucleus and in the nucleus of the solitary tract." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(5): E1348-1357.

Pfaus, J. G. (2009). "Pathways of sexual desire." *J Sex Med* 6(6): 1506-1533.

Pickavance, L., S. Dryden, et al. (1996). "Relationships between hypothalamic neuropeptide Y and food intake in the lactating rat." *Peptides* 17(4): 577-582.

Rahmouni, K. and D. A. Morgan (2007). "Hypothalamic arcuate nucleus mediates the sympathetic and arterial pressure responses to leptin." *Hypertension* 49(3): 647-652.

Ramkumar, T. and S. Adler (1999). "A requirement for the POU transcription factor, Brn-2, in corticotropin-releasing hormone expression in a neuronal cell line." *Mol Endocrinol* 13(8): 1237-1248.

Ranson, R. N., K. Motawei, et al. (1998). "The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat that closely appose sympathetic preganglionic neurones projecting to the stellate ganglion." *Exp Brain Res* 120(2): 164-172.

Rich-Edwards, J. W., A. P. Mohllajee, et al. (2008). "Elevated midpregnancy corticotropin-releasing hormone is associated with prenatal, but not postpartum, maternal depression." *J Clin Endocrinol Metab* 93(5): 1946-1951.

Rowatt, A. J., J. J. DePowell, et al. (2003). "ARNT gene multiplicity in amphibians: characterization of ARNT2 from the frog *Xenopus laevis*." *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 300(1): 48-57.

Russell, J. A., G. Leng, et al. (2003). "The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in pregnancy." *Front Neuroendocrinol* 24(1): 27-61.

Saper, C. B. (2002). "The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation." *Annu Rev Neurosci* 25: 433-469.

Schonemann, M. D., A. K. Ryan, et al. (1995). "Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2." *Genes Dev* 9(24): 3122-3135.

Seasholtz, A. F., F. J. Bourbonais, et al. (1991). "Nucleotide sequence and expression of the mouse corticotropin-releasing hormone gene." *Mol Cell Neurosci* 2(3): 266-273.

Sekine, H., J. Mimura, et al. (2006). "Unique and overlapping transcriptional roles of arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) and Arnt2 in xenobiotic and hypoxic responses." *J Biol Chem* 281(49): 37507-37516.

Shahrokh, D. K., T. Y. Zhang, et al. (2010). "Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the rat." *Endocrinology* 151(5): 2276-2286.

Shimada, M. and T. Nakamura (1973). "Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei." *Exp Neurol* 41(1): 163-173.

Siler, T. M., S. C. Yen, et al. (1974). "Inhibition by somatostatin on the release of TSH induced in man by thyrotropin-releasing factor." *J Clin Endocrinol Metab* 38(5): 742-745.

Silva, J. E. (2006). "Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation." *Physiol Rev* 86(2): 435-464.

Simeone, A., M. R. D'Apice, et al. (1994). "Orthopedia, a novel homeobox-containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and *Drosophila*." *Neuron* 13(1): 83-101.

Smagin, G. N., S. C. Heinrichs, et al. (2001). "The role of CRH in behavioral responses to stress." *Peptides* 22(5): 713-724.

Starcevic, V., V. Milosevic, et al. (2002). "Somatostatin affects morphology and secretion of pituitary luteinizing hormone (LH) cells in male rats." *Life Sci* 70(25): 3019-3027.

Stepanyan, Z., A. Kocharyan, et al. (2007). "Somatostatin, a negative-regulator of central leptin action in the rat hypothalamus." *J Neurochem* 100(2): 468-478.

Stepanyan, Z., A. Kocharyan, et al. (2003). "Leptin-target neurones of the rat hypothalamus express somatostatin receptors." *J Neuroendocrinol* 15(9): 822-830.

Strowski, M. Z., R. M. Parmar, et al. (2000). "Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptors subtypes: an in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice." *Endocrinology* 141(1): 111-117.

Sun, Y., B. Zupan, et al. (2009). "TRH-receptor-type-2-deficient mice are euthyroid and exhibit increased depression and reduced anxiety phenotypes." *Neuropsychopharmacology* 34(6): 1601-1608.

Swanson, L. W. and P. E. Sawchenko (1983). "Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei." *Annu Rev Neurosci* 6: 269-324.

Thomas, J. B., S. T. Crews, et al. (1988). "Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system." *Cell* 52(1): 133-141.

Tzeng, A. C., J. Cheng, et al. (2000). "A study of thyrotropin-releasing hormone for the treatment of spinal muscular atrophy: a preliminary report." *Am J Phys Med Rehabil* 79(5): 435-440.

Wang, W. and T. Lufkin (2000). "The murine *Otp* homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus." *Dev Biol* 227(2): 432-449.

Watts, A. G., L. W. Swanson, et al. (1987). "Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin in the rat." *J Comp Neurol* 258(2): 204-229.

Wen, Y. Q., J. N. Zhu, et al. (2004). "Cerebellar interpositus nuclear inputs impinge on paraventricular neurons of the hypothalamus in rats." *Neurosci Lett* 370(1): 25-29.

Winslow, J. T., N. Hastings, et al. (1993). "A role for central vasopressin in pair bonding in monogamous prairie voles." *Nature* 365(6446): 545-548.

Wong, L. F. and D. Murphy (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(1-2): 165-175.

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

Yang, C., D. Gagnon, et al. (2006). "Adenoviral-mediated modulation of *Sim1* expression in the paraventricular nucleus affects food intake." *J Neurosci* 26(26): 7116-7120.

Yang, I., J. Woo, et al. (1996). "Suppression of TRH-stimulated TSH secretion by glucose-induced hypothalamic somatostatin release." *Horm Metab Res* 28(10): 553-557.

Yao, S. T., S. Gouraud, et al. (2005). "Water deprivation increases the expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) but not orexin-A in the lateral hypothalamic area of the rat." *J Comp Neurol* 490(2): 180-193.

Young, W. S., 3rd, E. Shepard, et al. (1996). "Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition." *J Neuroendocrinol* 8(11): 847-853.

Figure IV-1. Alignement de la sonde *Otp*. Alignement en nucléotides de la séquence de la sonde *Otp* clonée chez le *Xenopus laevis* comparée au *Xenopus tropicalis* et à la souris.

Clonée	GGGAACAGCATTATGAATATATTCACCCTGCTGATCATGATGAGATGACTGCAGTTCTG
Tropicalis	GGGAACAGCATTATGAATATATCCACCCTGCTGATCATGATGAGATGACAGCAGTTCTG
Souris	GGGAACAGCATCTATGAATATATCCACCCGGCTGACCACGATGAGATGACAGCCGTGCTC ***** *
Clonée	ACAGCTCACCAGCCTTACCACTCACACTTTGTTTACAGGAATATGAGATTGAGCGCTCCTTC
Tropicalis	ACAGCTCACCAACCTTACCACTCACACTTTGTACAGGAATATGAGATTGAACGCTCCTTC
Souris	ACAGCCCATCAGCCCTACCACTCTCACTTTGTACAGGAGTACGAGATCGAACGCTCCTTC ***** *
Clonée	TTCCTACGGATGAAATGTGTTTTAGCAAAGCGGAACGCAGGGTTGACATGTGGTGGCTAT
Tropicalis	TTCCTACGGATGAAATGTGTTTTGGCAAAGAGGAATGCGGGGTTGACGTGTGGGGGTAT
Souris	TTTCTAAGGATGAAGTGTGTTTTGGCCAAGCGGAATGCTGGCTCACCTGCGGTGGCTAC *
Clonée	AAGGTGATACATTGCAGTGGGTACCTGAAGATTCGCCAGTACAGTCTGGACATGTGCGCA
Tropicalis	AAGGTGATACATTGCAGTGGGTACCTGAAGATTCGCCAGTACAGTCTCGACATGTGCGCA
Souris	AAGGTCATTCACTGTAGTGGTACCTGAAGATTCGCCAGTACAGCCTGGATATGTCTCCC ***** *
Clonée	TTTGATGGCTGCTATCAAAATGTGGGCCTGGTGGCTGTTGGCCATTCTCTTCTCCAGT
Tropicalis	TTTGATGGTTGCTATCAAAATGTGGGCCTGGTGGCTGTTGGCCATTCCCTCCCTCCAGT
Souris	TTTGATGGATGCTACCAAAATGTGGGCCTGGTGGCTGTTGGGTCCTCCCTGCCTCCGAGT ***** *
Clonée	GCAGTCACAGAGATTAACCTTACAGCAATATGTTTATGTTTACAGCCAGCCTAGATATG
Tropicalis	GCAGTCACAGAGATTAACCTTACAGCAATATGTTTATGTTTACAGCCAGCCTAGATATG
Souris	GCTGTGACAGAGATCAAACTACAGCAACATGTTTATGTTTCCGAGCCAGTCTGGATATG *
Clonée	AAGCTCATATTTTATGATTCCAGGGTAGCTGAATTAACCTGGATATGAGCCTCAAGATCTG
Tropicalis	AAGCTCATATTTTATGATTCCAGGGTAGCTGAATTAACCTGGATATGAGCCTCAAGATCTG
Souris	AAGCTTATTTTCTGGACTCCAGGGTGGCAGAGCTGACTGGATATGAACCTCAGGACTTG ***** *
Clonée	ATTGAAAAGACGTTATATCATCATGTCCATGGCTGTGACACGTTTTCATCTCCGCTGTGCA
Tropicalis	ATTGAAAAGACTTTATATCATCATGTCCATGGCTGTGACACATTTTCATCTTCGCTGTGCA
Souris	ATTGAGAAGACCCTGTACCATCACGTGCATGGCTGTGACACCTTCCACCTACGCTGTGCA ***** *
Clonée	CATCACTTGTGCTTGTGAAAGGACAGGTCACCACCAAGTACTACAGGTTCTGGCTAAG
Tropicalis	CATCACTTATGCTTGTGAAAGGACAGGTCACCACCAAGTACTACAGGTTCTGGCTAAG
Souris	CACCACCTACTGTTGGTGAAGGACAAGTGACCACCAAGTACTACAGGTTCTGGCGAAG *
Clonée	CACGGTGGCTGGGTGTGGGTACAGAGTTATGCTACCATTGTGCACAACAGCAGGTCCTCC
Tropicalis	CATGGTGGCTGGGTGTGGGTACAGAGTTATGCCACCATTGTACACAACAGCAGGTCCTCC
Souris	CAGGGCGGCTGGGTCTGGGTGCAGAGTTACGCCACCATCGTACACAACAGCCGCTCCTCC *
Clonée	AGACCCACTGCATTGTGAGTGTGAATTATGTTTCTAACGGATACAGAATACAAAGGATTA
Tropicalis	AGACCCACTGTATTGTGAGTGTGAATTATGTTTCTAACGGATACAGAATACAAAGGACTA
Souris	AGGCCGCACTGCATCGTCAGCGTCAACTACGTCCTCACAGACAGAATACAAAGGGCTA

```

** ** ***** ** ***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** **
Clonée          CAACTGTCTTTGGATCAAGTTACAAC----AAAACCACAATTCTCTTATGCAAGC---TC
Tropicalis     CAGCTATCTTTGGATCAAGTTACAAC----AAAGCCACCATTTCTTATACAAGC---TC
Souris         CAGCTCTCCCTGGACCAGATATCAGCCTCTAAGCCCACT-TTCTCCTATACCAGCAGTTC
** ** **   ** ** *   ** *   ** ** **   ** ** **   ** ** **

Clonée          AAATTCAACCATAAATGACAGCAGAAAATGCAGTAAATCTCGACTCTCCGGCACAAAATC
Tropicalis     AAATCCAACCATAAATGACAGCAGAAAAGCAGTAAAGCTCGACTCTCCAACACAAAATC
Souris         CACTCCCCTATCTCGGACAACAGGAAGGGGGCCAAGTCAAGGCTCTCCAGTAGCAAGTC
* * * * *      **** ** ** *   ** *   *   *****   * ** **

Clonée          GAAATCCAGAACCTCACCTACCCACAGTATTCTGGATTCCATACTGAACGATCTGAATC
Tropicalis     TAAATCCAGAACATCACCTACCCACAGTATTCTGGATTCCATACTGAACGATCTGAATC
Souris         AAAATCTAGGACCTCCCCATATCCCAGTATTCTGGGATTCCATACTGAGAGATCGGAATC
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ***** ***** ***** *****

Clonée          CGACCATGAAAGTCAATGGGGTGGTAGCCCCCTTACTGACACAGCTTTACCACAACCTTCT
Tropicalis     AGACCATGAAAGTCAATGGGGCGGTAGCCCTCTTACTGACACAGCTTCACCACAACCTTCT
Souris         TGACCATGACAGCCAGTGGGGTGAAGTCCCCTGACTGATACTGCCTCCCCACAGCTCCT
***** ** ** ***** ** ** ** ** ** ** ***** ** ** * ***** ** **

Clonée          TTGATCCAATTGAAAAGACCAAGCTTCCACCCAACACGAATGTATCTTGGTGCATA----
Tropicalis     T-GATCCCATAGAAA-GACCAAGCTCCCACC-AACACGA-TGTATCTTG-TGCATATAGA
Souris         G-GACCCA---GAGA-GGCTGGCTCTC----AGCACGAAT-TGTCCTG-TGCGTATAGG
** **   ** * * * * ** *   * ***** * * ** ** ** ** ** ** **

```

Figure IV-2. Alignement de la sonde *Sim1*. Alignement en nucléotides de la séquence de la sonde *Sim1* clonée chez le *Xenopus laevis* comparée au *Xenopus tropicalis* et à la souris.

```

Clonée      -----GTCCAAACCAAGGACGAACCCATATCACC---AGCCATATACATCATTCC--
Laevis      CAAGGTGAAGTCCAAACCAAGGACGAACCCATATCCCC---AGACATATACATCATTCC--
Souris      AAAGATGAAGACAAAGCTGAGAACCAACCCATATCCCCACAGCAATACAGCTCCTTCCA
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      ATTGGTGATAAACGGGATTGTTCCCAATATGGAAGCTGGAAAGGAAGTCCGACAATGAAC
Laevis      ATTGGTGATAAACGGGATTGTTCCCAATATGGAAGTTGGAAAGGAAGTCCGACAATGAAC
Souris      AATGG--ACAACTGGAGTGCAGCCAGGTGGGAAAGTGGAGAACTAGTCCCCCACAAAT
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      ACTGCCACTAACCAAGAACAG-AGCAACCATTAGAAAACAGTGAAGTGTATACACCCC
Laevis      ACTGCCACTAACCAAGAACAG-AGCAACCATTAGAAAACAGTGAAGTGTATACACCCC
Souris      GCTGTGGCTCCCCGGAACAGCAGCT-CCATTCAGAAGCCAGCGACCTTTTATATGGGCC
              *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      AACATACAGTCTGCCATTCTCTTACCACATATGGACATTTCCCTATGGACTCCCATGTACT
Laevis      AACATACAGTCTGCCATTCTCTTACCACATATGGACATTTCCCTATGGACTCCCATGTACT
Souris      GCCCTACAGCTCCCTTCTCTTACCATTATGGACACTTCCCATTTGGACTCTCACGTCTT
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      TAGCAGCAAAAAACAGGTGATGCCCTCTCGATACGGACAGCCTCAGAGTTCCTCCCCTTG
Laevis      TAGCAGCAAAAAACAGGTGATGCCCTCTCGATATGGACAGCCTCAGAGTTCCTCCCCTTG
Souris      CAGCAGCAAGAAGCCAGGATTGCCCGCAAGTTCGGGCAGCCCAAGGAT---CCCCGTG
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      TGAAGTGGCAAGATTTTTCTTCCAGCACTCTACAGAGCAGCGGGGAGTGCCACTGGCATT
Laevis      TGAAGTGGCAAGATTTTTCTTCCAGCACTCTACAGAGCAGCGGGGAGTGCCACTGGCATT
Souris      TGAGGTGGCAGCTTCTTCTGAGCACACTGCCAGCCAGCAGCAATGCCAGTGGCACTG
              *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      TGCCAATTCAGTTGT-TCCA--AGCTCTCCTCCA---AAAAATATTCATGAACAATCG--
Laevis      TGCCAATTCAGTTGT-TCCA--AGCTCTCCTCCA---AAAAATATTCATGAACAATCG--
Souris      TGCCAATTCAGTTGT-TCCA--AGCTCTCCTCCA---AAAAATATTCATGAACAATCG--
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      -GTAAGTCAAGTCCGGCACAAGTGGCACATAATTATGAAGC-----AACCAAAA--
Laevis      -GTAAGTCAAGTCCGGCACAAGTGGCACATAATTATGAAGC-----ACCAAAA--
Souris      TGTGAATGCTGCCCGCATGGTCTTGTGCCAAACTATGAAGCGCCCTCCGCAGCCGCGCG
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figure IV-3. Alignement de la sonde *Sim2*. Alignement en nucléotides de la séquence de la sonde *Sim2* clonée chez le *Xenopus laevis* comparée au *Xenopus laevis* et à la souris.

Clonée CCCTGCTCATGGCAACCACCATGGACCAGGGGCATGGAGGAGCAC--CGGCT-CTACCCA
 Laevis CCCTGCTCACGGCAACCACCATGGACCAGGGGCATGGAGGAGCAC--CGGCT-CTACCCA
 Souris CCACGCTGCCAACCACCATCCCGGGCCCGGGGCATGGCGGAGTGCGGCGGCTGCAGCTCA
 ** *** * **** * ** ** ***** ** * ***** * **

Clonée CCTG--TCCAGCATGGCTTCTCCAATGGTCAGGGGCTGCTGTA CTCTCAGCCCAGCTT
 Laevis CCTG--TCCAGCATGGCTTCTCCAATGGTCAGGGGCTGCTGTA CTCTCAGCCCAGCTT
 Souris CCTCCCTCCCTCCATGGGAGCTTCCAACGGC--GGTTTGTCTATTTCGAGCCGAGCTT
 *** ** ***** * ***** ** ** ***** ** * ***** *****

Clonée CACTGTCAATGGCATGATCAACCC---GGGCTCTGGGCAAGGCATTACCACCATGGGC
 Laevis CACTGTCAATGGCATGATCAACCC---GGGCTCTGGGCAAGGCATTACCACCATGGGC
 Souris CACGGTGAACGGCATGCTGGGCGCAGGAGGGCAGCCGGCTGGGC-TGCACCACACGGCC
 *** ** * ***** * * * ***** *** ** * ***** ** *

Clonée TCAGGGATTCCCACGACGACC---ACCACGGCGATCACGG---GCACCAGCAAG-TCTCC
 Laevis TCAGGGATTCCCACGACGACC---ACCACGGCGATCACGG---GCACCAGCAAG-TCTCC
 Souris TGAGGGACGCCACGATGAGCCACACCATGCAGACCACCCGCATCCGCACTCTCACC
 * ***** ***** ** * ***** * ** *** *** * ** * ** **

Clonée CAGGCGCAGCAACAGCACTCGC-AGCTC-----CAAGG-----GGG-----G
 Laevis CAGGCGCAGCAACAGCACTCGC-AGCTC-----CAAGG-----GGG-----G
 Souris CACAC-CAGCAACCGCCCCGCCACCTCCCCACAAGGCCACCGGGCCACCCAGGCGCG
 ** * ***** ** * ** * ** * ***** ***

Clonée CACCAAGATC---ACTCTGATGAGGACACCCCGACTTCAGATGACCTGGAGCAGTTTGCC
 Laevis CACCAAGATC---ACTCTGATGAGGACACCCCGACTTCAGATGACCTGGAGCAGTTTGCC
 Souris CACCACGACCCGCACTCGGACGAGGACACGCCGACCTCAGACGACCTGGAGCAGTTTGCC
 ***** ** * ***** ** ***** ***** ***** ***** *****

Clonée AAGCAGTTCAAGCAGAGGAGGATCAAGCTGGGATTTACACAGGCGGACGTCGGGCTGGCC
 Laevis AAGCAGTTCAAGCAGAGGAGGATCAAGCTGGGATTTACACAGGCGGACGTCGGGCTGGCC
 Souris AAGCAATTCAAGCAGAGGCGGATCAAACTCGGATTTACTCAAGCAGACGTCGGGCTGGCC
 ***** ***** ***** ** ***** ** * ***** *****

Clonée CTGGGCACCCCTCTATGGCAATGTCTTCTCTCAGACCACCATCTGTAGGTTGAGGCCCTG
 Laevis CTGGGCACCCCTCTATGGCAATGTCTTCTCTCAGACCACCATCTGTAGGTTGAGGCCCTG
 Souris CTTGGCACCCCTGTACGGCAACGTGTTCTCGCAGACCACCATCTGCAGGTTGAGGCCCTG
 ** ***** ** ***** * ***** ***** ***** ***** *****

Clonée CAGCTGAGCTTCAAGAACATGTGCAAGCTGAAGCCTTTGTTGAACAAGTGGCTGGAAGAG
 Laevis CAGCTGAGCTTCAAGAACATGTGCAAGCTGAAGCCTTTGTTGAACAAGTGGCTGGAAGAG
 Souris CAGCTGAGCTTCAAGAACATGTGCAAGCTGAAGCCTTTGTTGAACAAGTGGTTGGAAGAG
 ***** *****

Clonée GCGGACTCATCCTCCGGGAGCCCCACCAGTATAGACAAAATTCAGCCCAGGGAAGGAAA
 Laevis GCGGACTCATCCTCCGGGAGCCCCACCAGTATAGACAAAATTCAGCCCAGGGAAGGAAA
 Souris GCAGACTCATCCTCGGGCAGCCCCACCAGCATAGACAAGATCGCAGCGCAAGGGCGCAA
 ** ***** ** ***** ***** ** ***** ** * **

Clonée AGGAAAAGAGAACCTCCATAGAGGTCAGCGTCAAGGGGGCTCTGGAAGCCATTTCTC
 Laevis AGGAAAAGAGAACCTCCATAGAGGTCAGCGTCAAGGGGGCTCTGGAAGCCATTTCTC
 Souris CGGAAAAGCGGACCTCCATCGAGGTGAGCGTCAAGGGGGCTCTGGAAGCCATTTCTC
 ***** * ***** ***** ***** *****

Clonée AAGTGCCCGAAACCTTCAGCCCCGAGATCACCTCCCTTGGCGACAGTTTACAGTTAGAG
 Laevis AAGTGCCCGAAACCTTCAGCCCCGAGATCACCTCCCTTGGCGACAGTTTACAGTTAGAG
 Souris AAATGCCCTAAGCCCTCGGCCAGGAGATCACCTCCCTCGCGACAGTTTACAGCTGGAG
 ** ***** ** * ** * ** * ***** ***** ***** ***** * **

Figure IV-4. Alignement de la sonde *Brn2*. Alignement en nucléotides de la séquence de la sonde *Brn2* clonée chez le *Xenopus laevis* comparée au *Xenopus laevis* et à la souris.

```

Clonée      GTGGTTGCT---GCTT----CTTGGTAC-AACCG-TATCTC-ACATGGTGCACACA--CA
Laevis      GTGGTTGCT---GCTT----CTTGGTAC-AACCG-TATCTC-ACATGGTGCACACA--CA
Souris      ATGATGGCTCTGGCTTTGATCTTCGTGCTAACTGGTATCCCCAAATCCTGCGCCTTGCTG
          ** * ***      *****      *** * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      AGAGCAGCCTTTACTGGAGGAGGACACAGCACCATTAGATGATCTGGATGTTCTTGAGAA
Laevis      AGAGCAGCCTTTACTGGAGGAGGACACAGCACCATTAGATGATCTGGATGTTCTTGAGAA
Souris      GAAGCAGCC---CAGGAGGAAGGTGCTGTGACTCCTGACCTTCCAGGC---CTGGAGAA
          *****      * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      AGCCAAAGGT-ATCCTGATCCGAGTATCCTG--GAGGGATTTCAAGAAGG-GCAACAAA
Laevis      AGCCAAAGGT-ATCCTGATCCGAGTATCCTG--GAGGGATTTCAAGAAGG-GCAACAAA
Souris      AGTCCAGGTCCGGCCAGAACGTCGAT-TCTTGAGGAAAGACCTCCAGCGTGTGCGAGGGG
          ** * * * *      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      ACAACAGAGATCTACCAGATGCAATGGAAATGATATCTAAGCGCCAGCACCCAGGGAAAC
Laevis      ACAATAGAGATCTACCAGATGCAATGGAAATGATATCTAAGCGCCAGCACCCAGGGAAAC
Souris      ACCTTGGTGCTGCCTTAGATTCC-TGG--ATCACA--AAACGCCAGCATCCGGGCAAAA
          **      * * * *      ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      GATTCCAGGAGGAGATAGAAAAGAGACAAC-ACCCTGGAAGAGGG--ATCTGGAAGAT
Laevis      GATTCCAGGAGGAGATAGAAAAGAGACAAC-ACCCTGGAAGAGGG--ATCTGGAAGAT
Souris      G-----GGAGGAGA-AGGAGGAAGACGTTGAAGCCGAAGAGAGGGGAGATTTGGGAGAA
          *      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      CTG--AATCTAGAGCTTTC-CAAAAGGCAACACCCCGGAAGAAGATTTGTGGATGATGTA
Laevis      CTG--AATCTAGAGCTTTC-CAAAAGGCAACACCCCGGAAGAAGATTTGTGGATGATGTA
Souris      GTGGGAGCCTTGAGACCCACAAACGACAGCACCTGGCCGACG--TGCCAACCA--A
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      GAGAAGAGGCAACATCCAGGAAAGAGAGA-AGAGGGTGACTGGAGTAGGAGGTATCTGAC
Laevis      GAGAAGAGGCAACATCCAGGAAAGAGAGA-AGAGGGTGACTGGAGTAGGAGGTATCTGAC
Souris      GACAAGGATTCATGGTCAGATGAGGGGGACAGTACTGGCTGCCCCCGTCC-TGGCTACC
          ** ***      *      *** * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      AGATGACTCACGTTATTTGGACCTCC---TTTCTGATGTTTCC-----AAAAGACAGCA
Laevis      AGATGACTCACGTTATTTGGACCTCC---TTTCTGATGTTTCC-----AGGAGACAGCA
Souris      AGATTTCTT-----TCTGGATTCCTGGTTCTCAGATGCCCCCAAGTCAAGCGGCAGCA
          **** * *      * ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      CCCAGGCAAAAGAGTTCAGCCCC---ATTGT-----TTACAAAACGTCAACACCCA
Laevis      CCCAGGCAAAAGAGTTCAGCCCC---ATTGT-----TTACAAAACGTCAACACCCA
Souris      CCCTGGCAGGCGA--TCCTTCCCCTGGATGGAGTCTGATGTACCAAGAGGCAGCATCCA
          *** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Clonée      GGTAAGAGAGTGACAGA-----AG-----AAGAGGGTGATACTGAATTTGAAAACTCGAA
Laevis      GGTAAGAGAGTGACAGA-----AG-----AAGAGGGTGATACTGAATTTGAAAACTCGAA
Souris      GGCCGGAGGTTATAGATCCTGAGCTCCAAAGAAGCTGGGAA-GAAACAGAGGGAGAGGA
          **      *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```


Figure IV-7. Alignement de la sonde *Crh*. Alignement en nucléotides de la séquence de la sonde *Crh* clonée chez le *Xenopus laevis* comparée au *Xenopus laevis* et à la souris.

