

2 n 11.3274.1

Université de Montréal

**Rôle de *Sim1* et *Sim2* dans la guidance des axones du
corps mammillaire**

par

Jean-François Marion

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, 2004



© Jean-François Marion, 2004

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle de *Sim1* et *Sim2* dans la guidance des axones du corps mammillaire

Présenté par :
Jean-François Marion

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jacques Drouin, président-rapporteur

Dr. Jacques L. Michaud, directeur de recherche

Dr. Nathalie Lamarche, membre du jury

Résumé

Le corps mammillaire (CM) et ses projections axonales au thalamus (faisceau mammillo-thalamique, MTT) et au tegmentum (faisceau mammillo-tegmental, MTEG) sont des composants d'un important circuit critique pour la mémoire et l'apprentissage. Les facteurs de transcription SIM1 et SIM2 de la famille bHLH-PAS sont exprimés dans le CM en développement. Nous avons observé que les neurones du CM sont bien générés chez les embryons mutants pour *Sim1* (*Sim1^{-/-}; Sim2^{+/+}*), *Sim2* (*Sim1^{+/+}; Sim2^{-/-}*) ou *Sim1 et Sim2* (*Sim1^{-/-}; Sim2^{-/-}*). Cependant, le MTT et le MTEG sont absents chez les embryons *Sim1^{-/-}; Sim2^{-/-}* et réduits chez les embryons mutant pour *Sim1*, mais avec une ou deux copies de *Sim2*. Nous avons mis à profit un allèle nul de *Sim1* (*Sim1^{tlz}*), dans lequel le gène de fusion *tau-lacZ* a été introduit, pour marquer les axones provenant du CM. La coloration *lacZ* a montré que le MTT/MTEG est pratiquement indétectable chez les embryons *Sim1^{tlz/tlz}; Sim2^{+/-}* et *Sim1^{tlz/tlz}; Sim2^{-/-}*. Par contre, un groupe additionnel d'axones du CM, absent chez le contrôle, se dirige vers la ligne médiane ou la croise. Un phénotype intermédiaire est présent dans le CM d'embryons *Sim1^{tlz/tlz}; Sim2^{+/+}*. Nous avons confirmé ces observations avec un marquage au DiI. L'analyse de marqueurs *-Lhx1, Nkx2.1, Foxb1, Slit2, Robo1-* indique que les neurones du CM sont générés et sont maintenus au moins jusqu'au stade E18.5. Des études d'expression ont montré que *Sim1* et *Sim2* agissent dans une voie compensatoire, mais non hiérarchique. Nous proposons que *Sim1* et *Sim2* agissent de façon redondante pour contrôler le développement des axones du CM, possiblement en régulant l'expression de molécules médiant la guidance axonale.

Mots-clés : Sim1, Sim2, Guidance axonale, Axones, bHLH-PAS, Corps mammillaire

Abstract

The mammillary body (MB) and its axonal projections to the thalamus (mammillothalamic tract, MTT) and tegmentum (mammillotegmental tract, MTEG) are components of an important circuit involved in spatial learning. The bHLH-PAS transcription factors SIM1 and SIM2 are co-expressed in the developing MB. Using histological and marker analyses, we have found that MB neurons are generated in embryos lacking *Sim1* (*Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{+/+}), *Sim2* (*Sim1*^{+/+}; *Sim2*^{-/-}) or both *Sim1* and *Sim2* (*Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-}). However, the MTT and MTEG are absent in *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-} embryos and reduced in embryos lacking *Sim1*, but bearing one or two copies of *Sim2*, indicating a contribution of the latter to the development of MB axons. We have generated, by homologous recombination, a null allele of *Sim1* (*Sim1*^{tlz}) in which the *tau-lacZ* fusion gene was introduced, allowing staining of MB axons. Consistent with the histological studies, *lacZ* staining showed that the MTT/MTEG is barely detectable in *Sim1*^{tlz/tlz}; *Sim2*^{+/+} and *Sim1*^{tlz/tlz}; *Sim2*^{-/-} brains. Moreover, we have identified in these brains another group of MB axons, not found in controls, that cross the midline. An intermediate phenotype is observed in the MB of *Sim1*^{tlz/tlz}; *Sim2*^{+/+} embryos: the MTT/MTEG is clearly present, but smaller than in controls, and is accompanied by ectopic axons that cross the midline. The same patterns were observed when the MB axons were visualized with DiI. Expression studies showed that *Sim1* and *Sim2* act along compensatory, but not hierarchical pathways, suggesting that they play similar roles *in vivo*. We propose that *Sim1* and *Sim2* control the expression of molecules involved in the response of axon growth cone to guidance cues.

Keywords : Sim1, Sim2, Mammillary body, bHLH-PAS, Axons, Axonal guidance

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des sigles et abréviation	vii
Liste des figures	viii
Remerciements.....	xi
Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Généralités	1
1.2 Mécanismes modulant la guidance axonale.....	1
1.3 Dynamique du cône de croissance lors de la migration axonale	2
1.4 Les points de choix de la guidance axonale.....	4
1.4.1 La ligne médiane : point de choix majeur pour les axones.....	5
1.5 Familles de molécules modulant la guidance axonale.....	6
1.5.1 Les nétrines	7
1.5.2 Les Slits.....	13
1.5.3 Les récepteurs Robos interagissent avec les Slits	14
Chapitre 1 : Section 2	20
2.1 Le corps mammillaire	20
2.1.1 Développement du corps mammillaire	22
Chapitre 1 : Section 3	25
3.1 SIM1 et SIM2 sont des facteurs de transcription bHLH-PAS	25
3.2 Fonctions transcriptionnelles de Sim1 et Sim2.....	26
3.3 Patron d'expression de Sim1 et Sim2.....	27
3.4 <i>Sim1</i> et <i>Sim2</i> contrôlent la différenciation de cellules neuroendocrines.....	28
3.5 Les souris hétérozygotes pour <i>Sim1</i> sont hyperphagiques et obèses	32
3.6 Phénotype des souris mutantes pour <i>Sim2</i>	33
3.7 Sim est impliqué dans le développement de la ligne médiane.....	35

Hypothèses et objectifs	37
Chapitre 2 : Article	39
<i>Sim1</i> and <i>Sim2</i> are required for correct targeting of mammillary body axons.....	39
ABSTRACT	40
INTRODUCTION	41
MATERIAL AND METHODS	45
RESULTS	48
DISCUSSION	54
ACKNOWLEDGEMENTS	61
LEGENDS	76
Chapitre 3 : Discussion	80
1. Le noyau paraventriculaire versus le corps mammillaire	80
2. Le phénotype axonale chez les doubles mutants.....	80
3. Activités transcriptionnelles de <i>Sim1/Sim2</i>	84
4. Autres fonctions de <i>Sim1 et Sim2</i>	85
Bibliographie.....	I

Liste des sigles et abréviation

bHLH-PAS	<i>basic helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim</i>
CM	corps mammillaire
Comm	<i>commissureless</i>
CRH	corticotropine
DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
Mes	mésencéphale
MGA	molécules de guidance axonale
MTEG	faisceau mammillo-tegmentale
MTT	faisceau mammillo-thalamique
OT	ocytocine
PC	point de choix
PVN	noyau paraventriculaire
Robo	<i>roundabout</i>
Sim	<i>single-minded</i>
SNC	système nerveux central
SS	somatostatine
TRH	thyrotropine
VP	vasopressine
ZLI	zona limitans intrathalamica

Liste des figures

Chapitre 1. Introduction

Figure 1 : Mécanismes de guidance axonale lors du développement des neurones	3
Figure 2 : Progression des axones au travers des points de choix	4
Figure 3 : Représentation schématique de la ligne médiane impliquée dans la guidance des axones commissuraux et ipsilatéraux au niveau du SNC	5
Figure 4 : Trajectoire des axones commissuraux dans les mutants <i>nétrine-1</i>	8
Figure 5 : Phénotypes des mutants <i>nétrine</i> chez <i>Caenorhabditis elegans</i>	11
Figure 6 : Récepteurs associés aux nétrines chez la souris	13
Figure 7 : Phénotypes des mutations et de la surexpression de <i>slit</i> chez la Drosophile	15
Figure 8 : Répartition des récepteurs Robos à proximité de la ligne médiane	17
Figure 9 : Effet du complexe Robo/DCC en présence de Slit et de Nétrine	19
Figure 10 : Description des diverses connexions du CM	23
Figure 11 : Représentation du corps mammillaire et de ses faisceaux axonaux	23
Figure 12 : Organisation des domaines chez SIM, SIM1 et SIM2	26
Figure 13 : Domaines d'expression de <i>Sim1</i> et <i>Sim2</i> dans le cerveau en développement	28
Figure 14 : <i>Sim1</i> contrôle la différenciation de lignées cellulaires neuroendocrines dans l'hypothalamus	30
Figure 15 : Modèle du mode d'action de NXF dans les cellules neuronales	35
Figure 16 : Effet de la mutation et surexpression de <i>sim</i> au niveau de la ligne médiane chez la Drosophile	36

Chapitre 2. Article

Figure 1 : Coexpression of Sim1 and Sim2 in the developing mammillary bodies	67
Figure 2 : Organization of the MB projections	68
Figure 3 : MTEG and MTT development affected by Sim1/Sim2 gene dosage	69

Figure 4 : Creation of a Sim1 allele expressing Tau-lacZ	70
Figure 5 : LacZ staining of mammillary body axonal projections in E14.5 Sim1/Sim2 mutant embryos.	71
Figure 6 : Abnormal targeting of MB axons as revealed by DiI labelling	72
Figure 7 : LacZ staining of mammillary body axonal projections in E11.5 Sim1/Sim2 mutant embryos	73
Figure 8 : Loss of Foxb1 expression in E12.5 Sim1/Sim2 double mutants	74
Figure 9 : MB neurons survive until the end of gestation in Sim1/Sim2 double mutants	75

*To Jennifer, You taught me how to get the
best from myself. I love you so much.*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du laboratoire du Dr. Jacques Michaud à l'Hôpital Sainte-Justine. Tout d'abord Dr. Jacques Michaud, merci pour ton accueil ainsi que pour ton professionnalisme. J'ai beaucoup appris pendant mon séjour dans le laboratoire. *Thank you Chun for your expertise and your eternal "joie de vivre"*. Merci Sabine pour ta bonne humeur et ton éternel positivisme. Ce fut très apprécié. Aurore, merci pour ton calme exemplaire et tes précieux conseils. Et je m'en voudrais de ne pas remercier du plus profond de mon cœur Francine ma "deuxième maman". Si l'expérience de la maîtrise fut très agréable pour moi, c'est grâce à elle. Merci beaucoup Francine pour ton écoute, tes conseils et ta présence. Tu es vraiment une personne extraordinaire. Je m'ennuie déjà de ta montée de lait quotidienne de 9h50.

Merci aussi à ma famille, ma mère, mon frère, Manon, Samuel et Roxanne pour votre appui dans les moments forts tout comme dans les périodes plus creuses. Merci pour votre compréhension et vos encouragements. Nous formons un noyau familial très proche et c'est très réconfortant. Merci beaucoup et, oui Samuel, je suis toujours un scientifique.

I would also like to thank the Gignac family for their support. It would not have had been the same if I hadn't had the wonderful weekends out in the bush or just at home with you guys to relax and get away from the weekly stress.

Je voudrais aussi remercier mes amis Pierre-Luc Tanguay, Miguel St-Jean et Jean-Nicolas Pépin pour leurs conseils, mais aussi pour toutes ces soirées où on faisait autre chose que "stresser" pour notre maîtrise. Vive les mercredi relax!

Et finalement, merci Jennifer. Pour m'avoir supporté, enduré et secoué quand le moment le demandait. Tu es ma source d'inspiration et je te dois une grande partie de ce travail. Merci d'avoir cru en moi et pour avoir su me faire des câlins toujours au bon moment. Tu es ma douce, mon amie, ma compagne et je t'aime.

MERCI BEAUCOUP À TOUS ET CHACUN!!!

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Généralités

Le traitement de l'information par le cerveau met en jeu un réseau complexe de connexions entre les neurones. On estime que chaque neurone humain communique avec plusieurs milliers d'autres cellules cibles (Tessier-Lavigne et Goodman, 1996). La mise en place de ce réseau durant le développement requière des systèmes de guidance qui permettent une distribution précise et fiable des neurites. Dès leur émergence de la cellule, les axones et les dendrites sont soumis à plusieurs signaux qui influencent leur migration jusqu'à ce qu'ils atteignent leur cible. Une fois la cible atteinte, l'axone formera une synapse et l'échange d'information entre le neurone et la cellule cible pourra commencer.

1.2 Mécanismes modulant la guidance axonale

Les molécules de guidance axonale (MGA) peuvent attirer les axones vers leur source, ou encore, les repousser dans la direction opposée (figure 1A). Les MGA peuvent agir sur une courte distance ou une longue distance (Huber et al. 2003). L'attraction ou la répulsion à courte distance sont généralement effectuées par un contact entre les axones et les cellules produisant les MGA tandis que la guidance sur une longue distance implique des MGA sécrétées dans le milieu environnant. À la lumière de plusieurs expériences (De Castro et al. 1999 ; Kennedy, 2000), il semble qu'une même MGA peut avoir un effet attractif ou répulsif sur les axones. La bifonctionnalité de ces molécules dépend de l'état du cône de croissance situé à l'extrémité de l'axone.

1.3 Dynamique du cône de croissance lors de la migration axonale

Les axones progressent dans le milieu suite à l'établissement de la polarité neuronale. Cette étape se caractérise par la formation de prolongements différenciés liée à des modifications du cytosquelette constitué d'actine, de microtubules et de filaments intermédiaires (figure 1B). Des études ont démontré que, dans le neurone, la colchicine, inhibiteur de la polymérisation des microtubules, empêche l'élongation de l'axone et des dendrites, alors que la cytochalasine D, agent dépolymérisant l'actine, supprime la motilité du cône de croissance et entraîne une élongation des neurites (van Deurs et al. 1996). Ces résultats montrent l'importance, pour les neurites en développement, de la polymérisation des microtubules et des réarrangements rapides des filaments d'actine intervenant au niveau des filopodes et des lamellipodes des cônes de croissance.

C'est en alternant entre l'élongation et la rétraction des filopodes et des lamellipodes que les cônes de croissance dirigent les neurites en développement vers leurs cibles. Les filopodes sont des extensions cellulaires qui entraînent derrière eux les cônes de croissance. Lorsque les cônes de croissance atteignent leur cible finale, les filopodes disparaissent et laissent place au bouton synaptique.

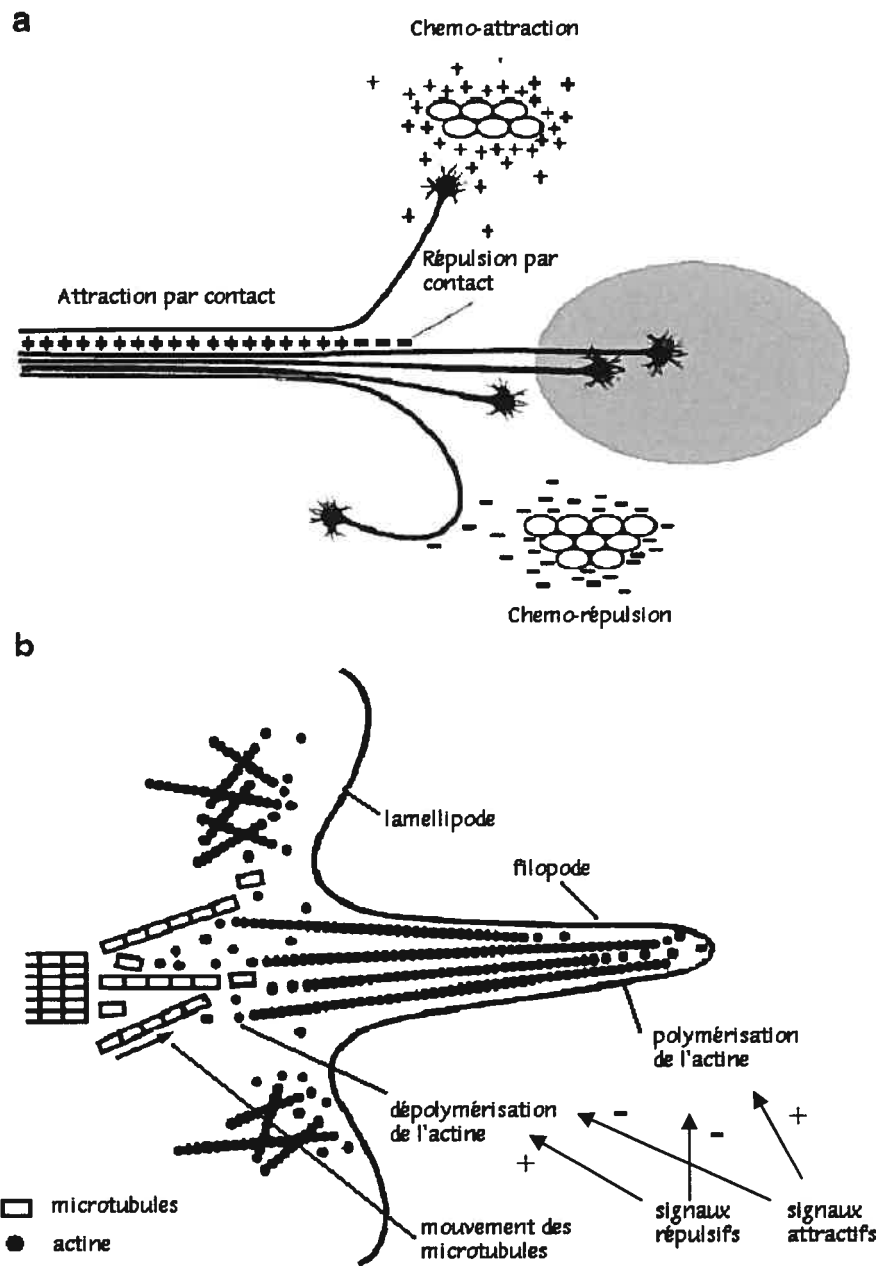


Figure 1: A) Les quatre mécanismes modulant la guidance axonale lors du développement des neurones. B) Composants et dynamique du cône de croissance lors de la progression des axones vers leur cible. Adapté de *Huber et al. 2003*

1.4 Les points de choix de la guidance axonale

Le parcours d'un axone peut être fragmenté en une série de petits segments (Tessier-Lavigne et Goodman, 1996). La problématique de la guidance axonale vise donc à comprendre comment l'axone rejoint les différentes cibles intermédiaires avant d'atteindre la cible finale. Chez les vertébrés comme chez les invertébrés, la jonction entre un segment intermédiaire et le début d'un autre segment se nomme point de choix (PC) (Kaprielian et al. 2000). Ces PC sont souvent composés de petits groupes de cellules spécialisées qui présentent aux cônes de croissance l'information requise, les MGA, pour faire progresser l'axone vers le prochain PC (figure 2).

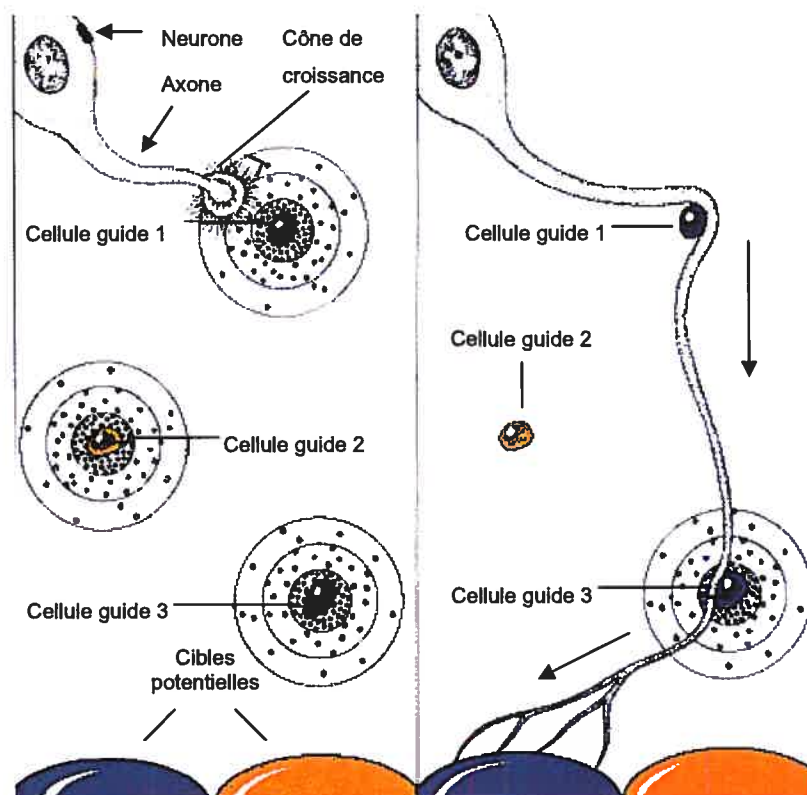


Figure 2: Progression des axones du neurone aux cibles avec l'aide des PC.
Image gracieuseté du "National Institut of aging (NIA)", faite par Lydia Kibiuk

1.4.1 La ligne médiane : point de choix majeur pour les axones

La ligne médiane du système nerveux central (SNC) est un point de choix important pour les axones autant chez les vertébrés que chez les invertébrés. Plusieurs axones se dirigent vers la ligne médiane et font face à la décision de continuer leur croissance du côté ipsilatéral ou du côté contralatéral. (Kaprielian et al. 2000). Chez les vertébrés, un exemple classique est celui du plancher de la moelle épinière en développement qui attire les neurones commissuraux dorsaux (Kennedy TE et al. 1994; Serafini T et al. 1994) (figure 3).

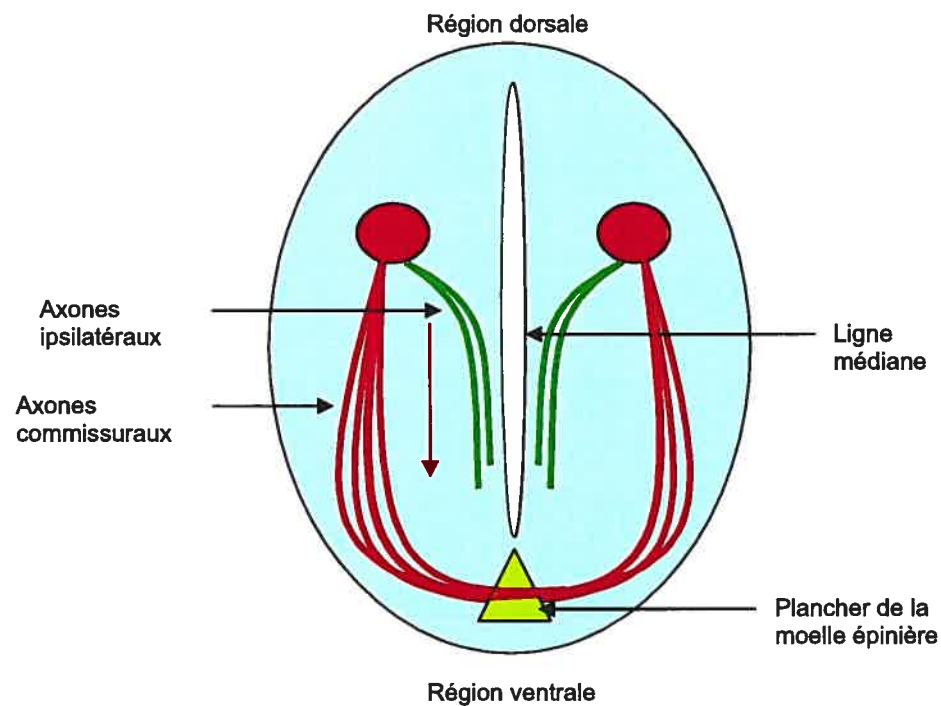


Figure 3: Représentation schématique de la ligne médiane impliquée dans la guidance des axones commissuraux et ipsilatéraux au niveau du SNC. Les axones commissuraux croisent la ligne médiane tandis que les axones ipsilatéraux progressent parallèlement à celle-ci.

De façon générale, si les axones ne croisent pas la ligne médiane, ils migreront de manière longitudinale et progresseront parallèlement à la ligne médiane rostralement ou caudalement (Kaprielian et al. 2000). Les axones qui franchissent la ligne médiane devront eux aussi suivre un patron de migration similaire. Les axones ne progressent jamais longitudinalement au sein de la ligne médiane et aucun ne la recroise une fois la progression dans le plan longitudinale amorcée (Kaprielian et al. 2000). Dans plusieurs modèles de guidance commissurale, l'attraction vers la ligne médiane impliquerait certaines cellules spécialisées (Kaprielian et al. 2000; Tessier-Lavigne et Goodman, 1996). Un modèle simple de cette hypothèse serait qu'un premier groupe de cellules serait responsable de l'attraction des axones vers la ligne médiane. Une fois à proximité de celle-ci, un autre groupe de cellules, sécrétant une ou de MGA différentes du premier groupe, prendrait en charge les axones et permettrait, par exemple, aux axones commissuraux de croiser la ligne médiane et non aux axones ipsilatéraux.

Le changement de réponse d'un axone est en relation directe avec la dynamique moléculaire au niveau de son cône de croissance et plus particulièrement de l'interaction ligand/récepteur des MGA.

1.5 Familles de molécules modulant la guidance axonale.

Les molécules impliquées dans la guidance axonale appartiennent à plusieurs familles de molécules. Quatre grandes familles de molécules agissant sur le développement des axones ont été caractérisés: les nétrines, les slits, les éphrines et les sémaphorines.

Prenant en considération la complexité des mécanismes régissant la guidance des axones et la pertinence des résultats préliminaires obtenus, nous n'allons décrire que deux familles: les nétrines et les slits.

1.5.1 Les nétrines

Les nétrines sont de petites protéines sécrétées qui agissent de manière bifonctionnelle sur les axones en les attirant ou en les repoussant aussi bien sur une longue que sur une courte distance. L'existence des nétrines a été postulée dès la fin du 19^{ième} siècle lorsque Santiago Ramon y Cajal émit l'hypothèse du chémotropisme : la progression des axones en développement est dirigée par un gradient d'une MGA qui agit à longue distance (Ramon y Cajal, 1892).

En 1909, il suggéra que les axones commissuraux de la moelle épinière suivent un gradient d'une MGA pour atteindre la ligne médiane ventrale (Ramon y Cajal, 1909). Depuis, il a été démontré que le plancher de la moelle épinière sécrète les nétrines qui peuvent initier et orienter la progression des axones commissuraux (Tessier-Lavigne et al. 1988; Placzek et al. 1990).

Les nétrines semblent avoir conservées leur rôle dans la guidance des axones vers la ligne médiane au cours de l'évolution. En effet, chez le Nématode, la Drosophile et les vertébrés il existe au moins une nétrine exprimée au niveau de la ligne médiane. (Tessier-Lavigne & Goodman, 1996; Meyerhardt et al. 1999; Skarnes et al. 1995; Serafini et al. 1996; de la Torre et al. 1997; Lauderdale et al. 1997). Chez la plupart des vertébrés, deux

nétrines (nétrine-1 et nétrine-2), sont exprimées dans le plancher de la moelle épinière en développement au même moment où les axones commissuraux progressent ventralement (Kennedy et al. 1994). Une souris mutante pour le gène murin *nétrine-1* fut générée (Skarnes et al. 1995). En absence de nétrine-1, la croissance des axones commissuraux est très désorganisée (aucune formation d'un faisceau abondant en axones) et des projections médiales apparaissent et se dirigent vers le ventricule à différents niveaux de la ligne médiane (Serafini et al. 1996) (figure 4).

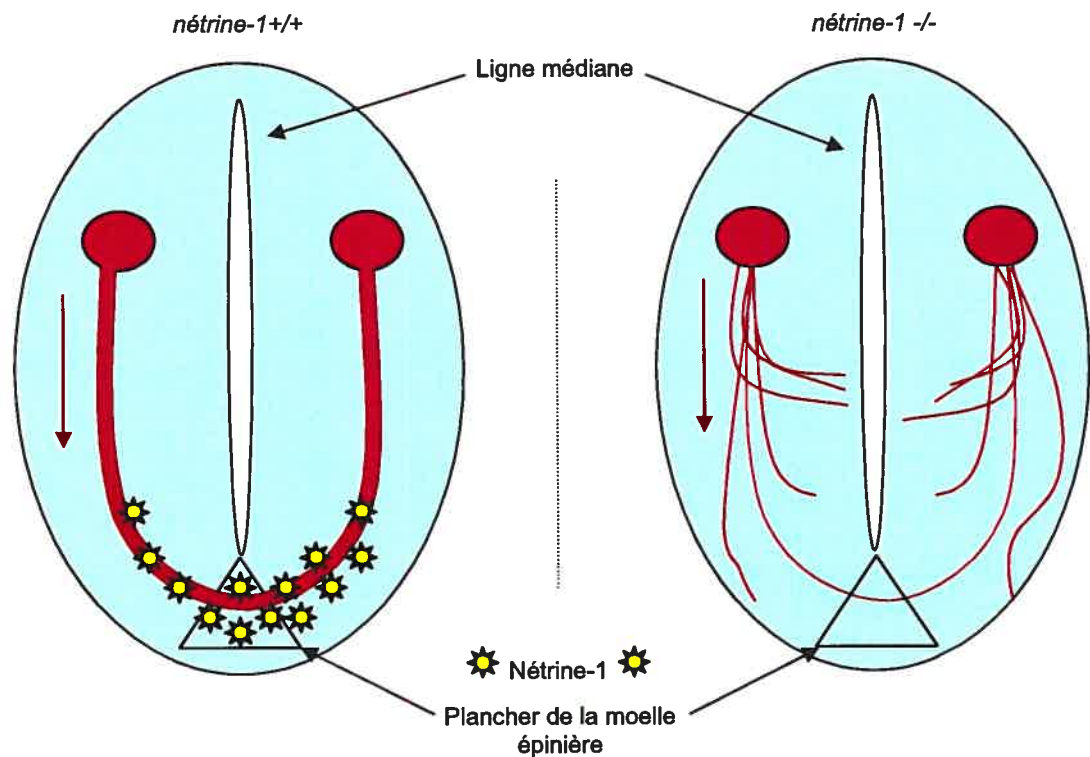


Figure 4: La trajectoire des axones commissuraux est affectée dans les mutants *nétrine-1* chez la souris. La croissance des axones est très désorganisée et peu d'axones commissuraux rejoignent le plancher de la moelle épinière.

Ces erreurs peuvent être expliquées du fait que les axones commissuraux sont confus et ne peuvent localiser la ligne médiane en absence de *nétrine-1*. Le problème de guidance dans ce cas n'est cependant pas total. Chez le mutant *nétrine-1* quelques axones commissuraux ont un patron migratoire normal. Il se peut que l'expression résiduelle de *nétrine-1* chez le mutant soit suffisante pour guider cette petite population d'axones vers le plancher de la moelle épinière. Une alternative pour expliquer cette observation mettrait en jeu une autre MGA présente au niveau du plancher de la moelle épinière capable de guider une sous-population d'axone non sensible à *nétrine-1* (Serafini et al. 1996). En effet, un papier récent du groupe de Tessier-Lavigne (Charron et al. 2003) suggère que le morphogène Sonic hedgehog (Shh) participerait avec *netrine-1* à la guidance axonale des neurones commissuraux vers la ligne médiane. Ils démontrent dans leurs expériences que Shh imitent la guidance des axones *nétrine-1* indépendante. Par des études de perte de fonctions, ils ont trouvé que Smoothened (Smo), requis dans la transmission du signal de Shh, était nécessaire pour l'attraction des axones *nétrine-1* indépendante et pour la projection normale des axones commissuraux.

Chez les mutants *nétrine-1*, le *corpus callosum*, la commissure antérieure ainsi que la commissure de l'hippocampe ne se forment pas, ce qui indique que *nétrine-1* est aussi requis pour le développement normal de multiples faisceaux axonaux qui croisent la ligne médiane dans le cerveau (Serafini et al. 1996; Fazeli et al. 1997).

Chez la *Drosophile*, deux gènes de la famille des nétrines ont été identifiés. Ils sont exprimés au niveau des cellules gliales de la ligne médiane ventrale lors de la progression

des axones longitudinaux et commissuraux (Mitchell et al. 1996). Chez les doubles mutants, les commissures, en particulier la commissure postérieure, sont beaucoup plus minces que chez le type sauvage et souvent, elles sont absentes (Mitchell et al. 1996). Des cassures au niveau des faisceaux des axones ipsilatéraux sont aussi répertoriées.

Unc-6 chez *Caenorhabditis elegans* fut le premier membre de la famille des nétrines à être découvert (Hedgecock et al. 1990; Ishii et al. 1992). Il est exprimé dans une population bien précise de cellules située à la ligne médiane ventrale au moment de la progression des axones. Des mutations de *unc-6* provoquent une migration erronée des axones migrant vers les régions dorsales et ventrales. Ce phénomène est observé principalement au niveau des axones situés près de la circonférence du nématode. (Hedgecock et al. 1990) (figure 5).

Deux autres mutations, *unc-40* et *unc-5*, chez le même organisme, montrent chacun un sous-phénotype du phénotype observé dans la mutation *unc-6* (Hedgecock et al. 1990). Chez le mutant *unc-40* le défaut de croissance touche les axones qui migrent en direction ventrale que chez le mutant *unc-5* se sont les axones migrant en direction dorsale qui sont affectés (figure 5). Suite à ces observations, Hedgecock et al. ont suggéré que *unc-6* codait pour une MGA sécrétée dans le milieu environnant et que *unc-5* et *unc-40* codaient pour des récepteurs de *unc-6* ayant différents effets sur les axones.

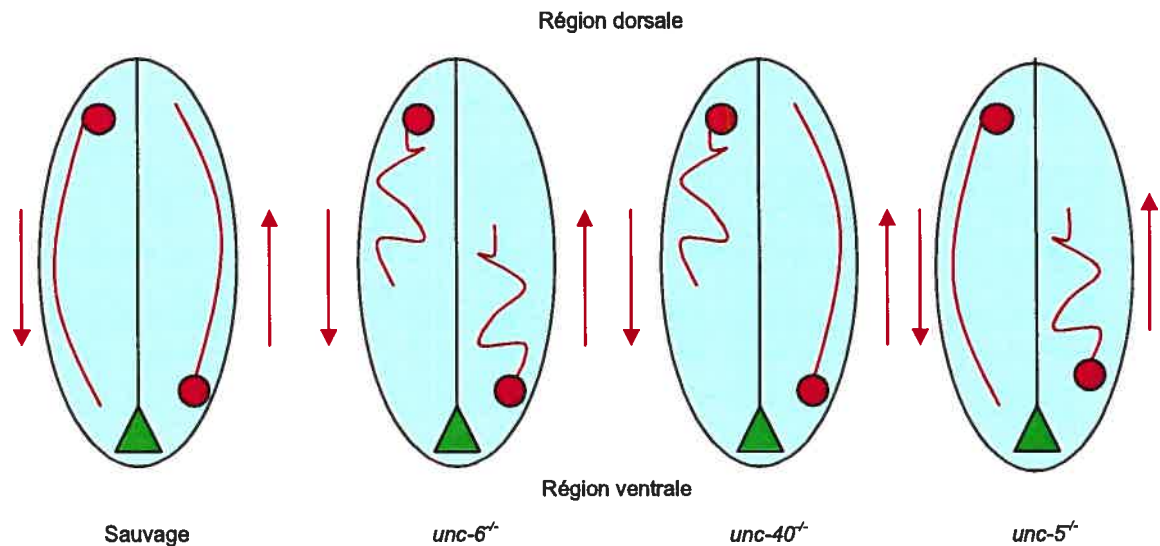


Figure 5: Comparaison des phénotypes axonaux de mutants nétrine chez *Caenorhabditis elegans*. Le mutant *unc-6* montre des défauts de guidance des axones périphériques se dirigeant vers la région ventrale et la région dorsale. La mutation de *unc-5* affecte la migration des axones périphérique se dirigeant vers la région dorsale tandis que la mutation *unc-40* affecte la migration des axones périphérique se dirigeant vers la région ventrale.

L'homologue de *unc-40* chez la souris, DCC, est exprimé par les neurones commissuraux (Keino-Masu et al. 1996). L'attraction des axones vers la ligne médiane par les nétrines passe par ce récepteur. Pour vérifier cette proposition, la fonction de DCC fut bloquée à l'aide d'anticorps. Les résultats ont montré que cette "perte de fonction" empêche l'attraction des axones généralement induite par le plancher de la moelle épinière (Keino-Masu et al. 1996). Chez les souris mutantes pour DCC, il a été observé que, tout comme pour les souris mutantes pour *nétrine-1*, les axones commissuraux ne se rendent pas au niveau du plancher de la moelle épinière (Serafini et al. 1996). DCC interagit physiquement avec Nétrine-1 et cette liaison est nécessaire à l'attraction des axones par Nétrine-1 *in vitro*

(Keino-Masu et al. 1996). Lorsque DCC lie Nétrine-1, il s'homodimérise par son domaine cytoplasmique et provoque une cascade de signalisation qui conduit à l'attraction des axones (Stein & Tessier-Lavigne, 2001).

Non seulement les récepteurs UNC-5 sont différents des récepteurs DCC sur le plan structural, mais ils ont aussi une activité de guidance axonale distincte puisque chez le nématode comme chez la souris, *unc-5* est associé à des phénomènes de répulsion des cônes de croissance. La mutation de UNC-5 empêche les axones de s'éloigner du plancher de la moelle tandis qu'une expression ectopique de UNC-5 entraîne une répulsion tant chez les axones non sensibles aux nétrines que chez les axones qui sont attirés par les nétrines via le récepteur DCC (Hamelin et al. 1993; Hong et al. 1999). Dans le premier cas, UNC-5 seul provoque la répulsion des axones du côté opposé à la source de nétrine tandis que la conversion de réponse dans le deuxième cas est le résultat d'une interaction directe entre les récepteurs DCC et UNC-5 (Keleman & Dickson, 2001). Dans le nouveau complexe DCC/UNC-5, la fonction attractive de DCC est réprimée (figure 6).

Les neurones exprimant DCC dans leur cône de croissance seront attirés vers la source de nétrine tandis que les neurones exprimant DCC et UNC-5 seront repoussés depuis une longue distance. Les neurones n'exprimant que UNC-5 seront repoussés mais seulement à proximité de la source de nétrine (Dickson & Keleman, 2002). En fait, à longue distance, la concentration de nétrine est faible. UNC-5 utilise les récepteurs DCC pour potentialiser son effet de répulsion (Dickson & Keleman, 2002).

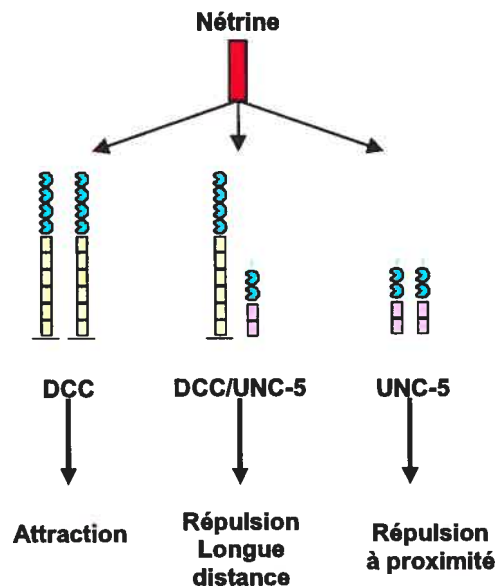


Figure 6: Les récepteurs associés aux nétrines chez la souris. DCC intervient dans l'attraction des axones vers la ligne médiane tandis que UNC-5 est impliqué dans les phénomènes de répulsion.

1.5.2 Les Slits

Chez la *Drosophila*, *slit* est exprimé au niveau des cellules gliales de la ligne médiane du SNC et agit pour empêcher les axones ipsilatéraux de croiser la ligne médiane et les axones commissuraux de recroiser la ligne médiane (Kidd et al. 1999; Rajagopalan et al. 2000a-b; Simpson et al. 2000a-b) (figure 7A). Cette MGA est sécrétée dans le milieu où elle se lie à un récepteur pour contrôler la répulsion de certains axones qui lui sont sensibles. Chez les mutants *slit*, les axones ipsilatéraux et commissuraux pénètrent dans la ligne médiane et n'en ressortent plus (Kidd et al. 1999) (figure 7B). Slit semble aussi impliqué dans l'établissement de la position latérale de certains faisceaux axonaux longitudinaux qui migrent de manière rostro-caudale dans le SNC de la *Drosophila* (Huber

et al. 2003). Ainsi, chez le mutant *slit* tous les faisceaux longitudinaux ne forment qu'un seul faisceau à la ligne médiane alors qu'une surexpression de *slit* provoque un déplacement latéral des faisceaux axonaux (Yu & Bargmann, 2001) (figure 7C). Lors d'études pour mieux comprendre les fonctions de Slit, la famille Roundabout (Robo) fut identifiée comme récepteurs de Slit.

1.5.3 Les récepteurs Robos interagissent avec les Slits

Chez la Drosophile, il existe trois Robos : Robo, Robo2 et Robo3 qui agissent comme récepteurs pour Slit. Chez les mutants *robo*, les axones croisent et recroisent la ligne médiane sans restriction (Seeger et al. 1993). Ceci suggère que Slit agit via le récepteur Robo pour prévenir les croisements illicites à la ligne médiane. Cependant, les axones ne sont pas confinés dans la ligne médiane comme ils le sont chez les mutants *slit* (Rothberg et al. 1990). Des études plus poussées sur Robo2 et Robo3 ont identifié ces derniers comme étant des récepteurs interagissant beaucoup plus loin avec Slit pour positionner les axones longitudinaux à une bonne distance de la ligne médiane (Rajagopalan et al. 2000a-b).

Chez les mutants *robo2* et *robo3*, les axones longitudinaux se repositionnent plus près de la ligne médiane. Si on provoque un gain de fonction de ces deux gènes, les mêmes axones se déplacent latéralement plus loin de la ligne médiane (Rajagopalan et al. 2000a-b). Ceci porte à croire que la décision de croiser la ligne médiane dépend majoritairement de Robo mais que Robo2 et Robo3 sont requis pour assurer la fidélité des choix dans le

positionnement des axones par rapport à la ligne médiane (Rajagopalan et al. 2000a-b) (figure 8).

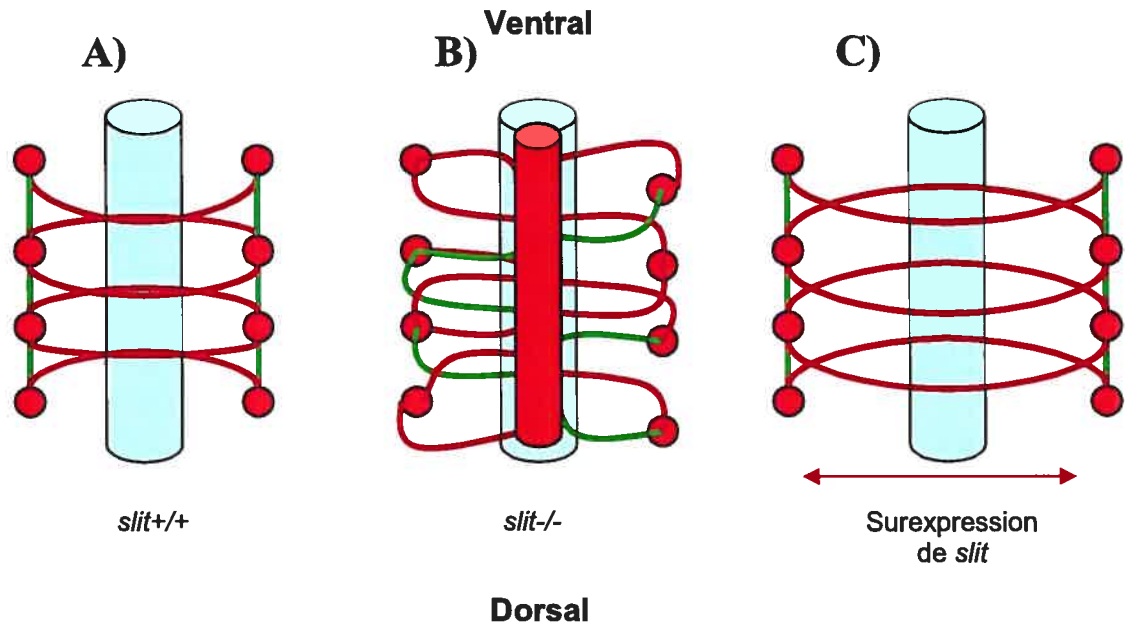


Figure 7: Représentation schématique des phénotypes rencontrés chez les contrôles *slit* (A), les mutants *slit* (B) ainsi que lors d'une surexpression de *slit* (C) au sein de la ligne médiane de la Drosophile. En A), on remarque que les axones ipsilatéraux (verts) migrent longitudinalement à la ligne médiane tandis que les axones commissuraux croisent la ligne médiane (rouges). En B), chez le mutant, les axones ipsilatéraux et commissuraux entrent dans la ligne médiane et n'en ressortent plus. En C), une surexpression de *slit* provoque un déplacement (flèche) des faisceaux migrant parallèlement à la ligne médiane.

Les récepteurs Robo sont exprimés dans des domaines différents le long de l'axe médio-latéral constituant un code qui détermine la position médio-latéral des axones longitudinaux. (Guthrie, 2001). L'expression des trois récepteurs se chevauche partiellement dans les faisceaux axonaux médians, intermédiaires et latéraux. Les faisceaux médians n'expriment que Robo, les faisceaux intermédiaires expriment Robo ainsi que

Robo3 et les faisceaux latéraux expriment les trois récepteurs (Simpson et al. 2000a-b; Rajagopalan et al. 2000a-b) (figure 8).

Pour résumer le fonctionnement de Slit et des Robos, on peut déduire que les axones ipsilatéraux expriment, sur leur cône de croissance, le récepteur Robo en combinaison avec les autres récepteurs (Robo2/Robo3), ce qui les empêchent de progresser au-delà de la ligne médiane et favorise leur migration dans la zone médiane, intermédiaire ou latérale. Pour ce qui est des axones commissuraux, le phénomène est un peu plus complexe. Les axones sont attirés vers la ligne médiane par des MGA et durant ce processus, ils ne répondent pas au phénomène de répulsion de Slit. Ceci est probablement dû à une diminution de l'expression des récepteurs Robos sur les cônes de croissance. Une fois la ligne médiane franchie, les cônes de croissance des axones réexpriment les récepteurs Robos et favorisent ainsi l'éloignement de la ligne médiane vers la zone médiane, intermédiaire ou latérale. On peut penser que ce phénomène se produit en combinaison avec la désensibilisation aux MGA (comme nétrine) qui ont attirées les axones vers la ligne médiane.

Un moyen d'expliquer ce processus réside dans l'interaction Slit-Robo avec d'autres MGA comme les nétrines (Stein & Tessier-Lavigne, 2001). Des expériences effectuées avec les axones de la moelle épinière chez *Xenopus* ont démontré que l'association de Robo et DCC peu entraîner deux effets importants sur la guidance axonale. Dans un premier temps, suite à la liaison de Slit sur Robo, si un récepteur DCC est présent, il y aura dimérisation entre Robo et DCC. Une fois sous sa forme hétérodimérique DCC ne répondra plus aux nétrines et l'effet attractif sera atténué (Yu & Bargmann, 2001) (figure 9A).

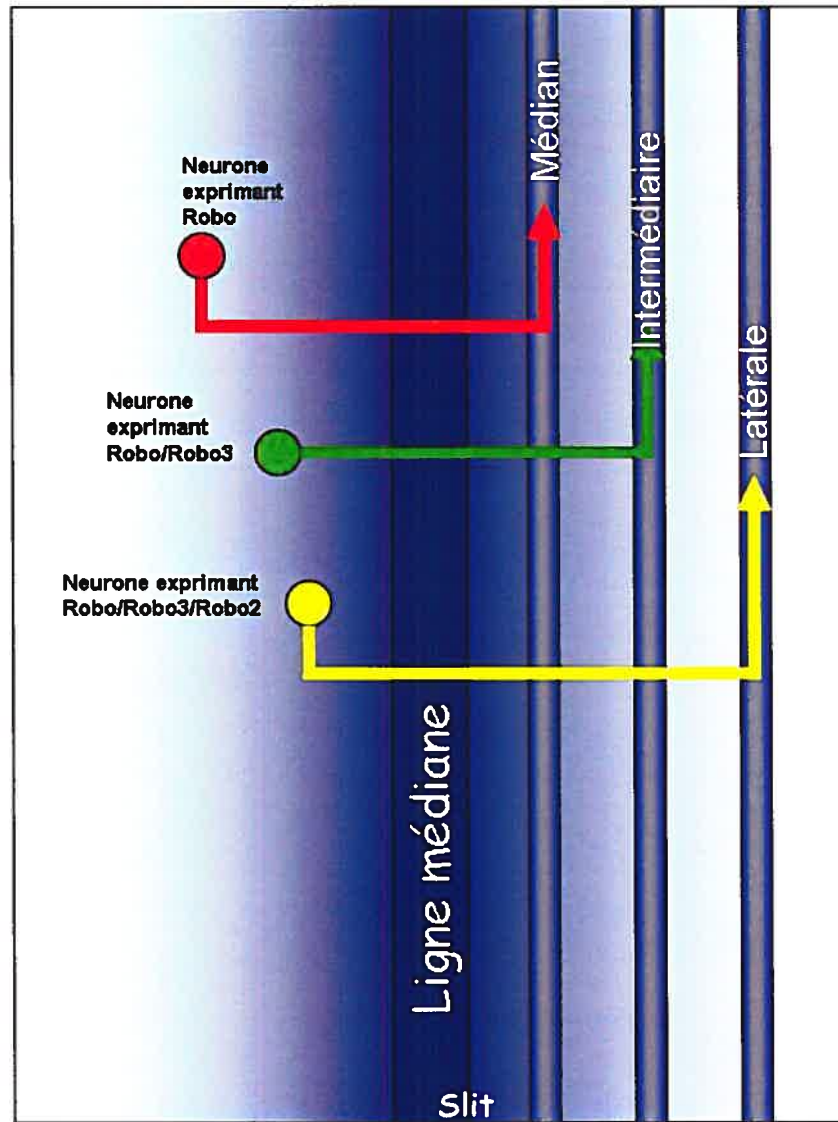


Figure 8: Arrangement des récepteurs Robos pour guider les axones sensibles à Slit chez la Drosophile. Seuls les axones commissuraux sont présentés ici. Les axones ipsilatéraux répondent de la même manière mais, ils ne croisent pas la ligne médiane. Les neurones exprimant Robo uniquement migrent dans la région médiane à la ligne médiane, les neurones exprimant Robo et Robo3 vont migrer dans une région plus intermédiaire. Les axones exprimant Robo, Robo2 et Robo3 se dirigent vers la zone latérale (axones commissuraux) ou s'arrêtent au niveau de la zone latérale (axones ipsilatéraux). *Adapté de Tear G. Nature 2001(409), p473*

Par contre, si DCC et Robo sont hétérodimérisés suite à la liaison de Slit mais qu'il n'y a pas de nétrines dans le milieu environnant, les axones seront repoussés sous l'effet de Slit (Yu & Bargmann, 2001) (figure 9B).

Chez les mammifères, trois Slits ont été clonés (Slit-1, Slit-2, Slit-3) (Holmes et al. 1998 ; Itoh et al. 1998). Ils sont tous exprimés dans le plancher de la moelle épinière au moment où les axones commissuraux se développent (Brose et al. 1999). Des expériences avec Slit-2 ont démontré que la fonction répulsive semblait être conservée chez les mammifères puisque des cellules COS exprimant Slit-2 repoussaient les axones moteurs provenant d'un explant de la moelle épinière ventrale.

Ceci corrobore avec une autre expérience qui a démontré, *in vitro*, que les cellules du plancher de la moelle épinière peuvent repousser les axones moteurs se développant dans celle-ci (Guthrie & Pini, 1995). Aucun résultat, malgré plusieurs essais, n'a été publié jusqu'ici sur l'implication des Slits dans la répulsion des axones commissuraux (Brose et al. 1999 ; Li et al. 1999). Ce qu'on sait par contre c'est qu'il existe trois récepteurs Robos chez les mammifères : Robo1, Robo2 et Rig-1. Seulement les deux premiers ont démontré une capacité de liaison aux Slits. Il reste encore à prouver que le dernier récepteur identifié ne peut lier les Slits.

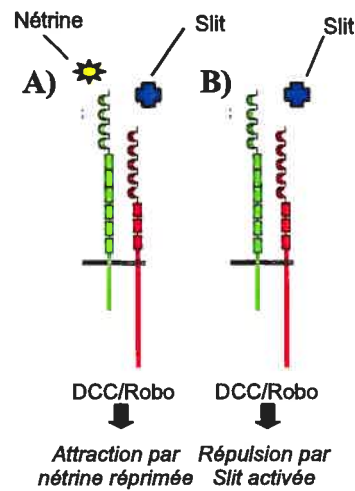


Figure 9: Effet du complexe Robo/DCC en présence de Slit et en présence de Nétrine et Slit. Suite à la liaison de Slit sur Robo, si un récepteur DCC est présent, il y aura dimérisation entre Robo et DCC. Une fois sous sa forme hétérodimérique DCC ne répondra plus aux nétrines et l'effet attractif sera atténué (A). Si DCC et Robo sont hétérodimérisés suite à la liaison de Slit mais qu'il n'y a pas de nétrines dans le milieu, les axones seront repoussés sous l'effet de Slit (B).

Chapitre 1 : Section 2

2.1 Le corps mammillaire

Les corps mammillaires (CMs) sont situés de chaque côté de la ligne médiane à la partie la plus postérieure de l'hypothalamus. Ils sont composés de deux noyaux principaux : le noyau latéral et le noyau médian (figure 10) (Risold & Swanson, 1995). Le noyau médian est le plus grand et contient de un à cinq sous-noyaux. Le nombre de sous-noyaux est variable selon les différentes espèces. Le noyau latéral est beaucoup plus compacte mais renferme un plus grand nombre de cellules que toutes les autres structures des CMs. Les CMs reçoivent des projections de l'hippocampe, via la fornix, et projettent au thalamus antérieur via le faisceau mammilo-thalamique (MTT). Ces régions du cerveau jouent un rôle critique dans les processus de la mémoire spatiale (figure 11) (Vann & Aggleton, 2004). Les neurones des CMs projettent aussi au tegmentum via le faisceau mammillo-tegmental (MTEG). Le rôle de ces projections reste encore mal caractérisé.

Les évidences cliniques de certaines maladies comme le syndrome de Korsakoff suggèrent l'implication des CMs dans les processus de mémoire (Ban & Zyo, 1963 ; Vann & Aggleton, 2003 ; Tanaka et al. 1997). Le syndrome de Korsakoff est une forme d'amnésie bien connue causée par une déficience en thiamine souvent associée à l'alcoolisme. Les dommages cérébraux de ce syndrome amènent une amnésie antérograde qui va en s'aggravant. Ce syndrome peut aussi s'accompagner d'une amnésie rétrograde (les souvenirs les moins anciens disparaissant les premiers). Les CMs des patients atteints de ce syndrome sont lésés en partie ou en totalité.

L'implication des CMs dans la mémoire spatiale fut étudiée à l'aide de modèles animaux ayant subi des lésions de ces régions (Aggleton et al. 1990; Aggleton et al. 1995; Aggleton et al. 1996 ; Sutherland & Rodriguez, 1989; Vann & Aggleton, 2003). Ces études ont généré une hypothèse selon laquelle les noyaux mammillaires, médian et latéral, contribueraient au processus de la mémoire spatiale de façon complémentaire (Vann & Aggleton, 2004). La lésion de la région totale des CMs montrait des défauts plus importants des processus de la mémoire spatiale que les lésions touchant uniquement le noyau médian ou le noyau latéral.

Les cellules contrôlant la direction de la tête chez les animaux est un autre exemple de l'implication au niveau des CMs, de deux systèmes complémentaires. Ces cellules aident à la navigation de l'animal en envoyant des signaux spécifiques lorsque l'animal regarde vers une direction précise dans le plan horizontal (Taube J.S. 1998). Seul le noyau mammillaire latéral et ses cibles contiennent les cellules de direction de la tête (Blair et al. 1998). Il a été avancé que le noyau mammillaire latéral pourrait être le seul à intervenir dans les fonctions de mémoire associées avec les CMs. Cependant lorsqu'une lésion est effectuée au niveau de la portion dorsale du noyau thalamique antérieur, région reliée uniquement au noyau latéral, les déficits observés sont moins sévères que dans le cas où toute la région du thalamus antérieur, reliée au deux noyaux mammillaires, est lésée (Aggleton et al. 1996). Cet effet additif laisse croire que les cellules de direction de la tête ne sont pas les seules responsables des déficits rencontrés chez les animaux avec des lésions dans la région mammillaire et du thalamus antérieur.

2.1.1 Développement du corps mammillaire

La plupart des axones du CM projettent vers le thalamus antérieur et le tegmentum via deux faisceaux majeurs: Le MTT et le MTEG. Le MTEG est un des faisceaux qui apparaît le plus précocement au cours du développement de la souris puisqu'il est détectable à 10.0 jours après la conception (E10.0) (Easter et al. 1993). Beaucoup plus tard, au stade E17.5, chaque axone du MTEG produit une collatérale vers le complexe thalamique inférieur formant le MTT (Hayakawa & Zyo, 1989).

Le MTT ne se forme pas chez les souris mutantes pour le facteur de transcription PAX6 (Valverde et al. 2000). *Pax6* n'est pas exprimé au niveau du CM mais l'est dans le thalamus ventral. L'absence de *Pax6* n'affecte pas le développement du MTEG puisque les souris mutantes pour ce gène naissent avec un MTEG intact (Valverde et al. 2000). À la lumière de ces recherches, il a été proposé que *Pax6* contrôle l'expression d'une molécule requise pour le développement du MTT.

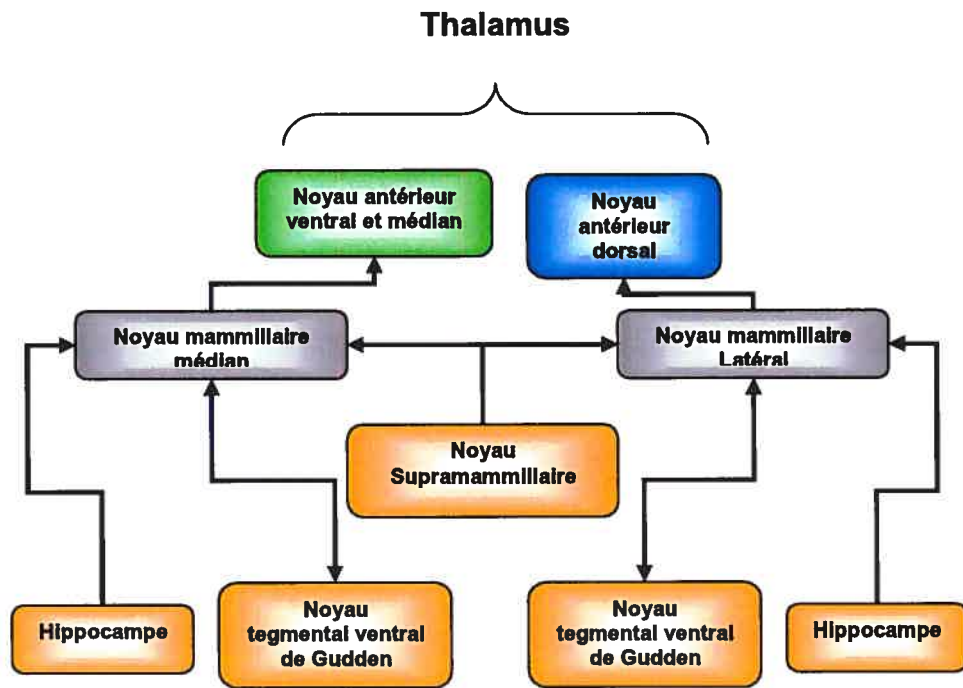


Figure 10: Description des diverses connexions du CM. Les deux sous-noyaux du CM sont reliés aux mêmes régions du cerveau mais dans des domaines différents.

Tiré de Vann & Aggleton, 2004, Nature review neuroscience 5, p36.

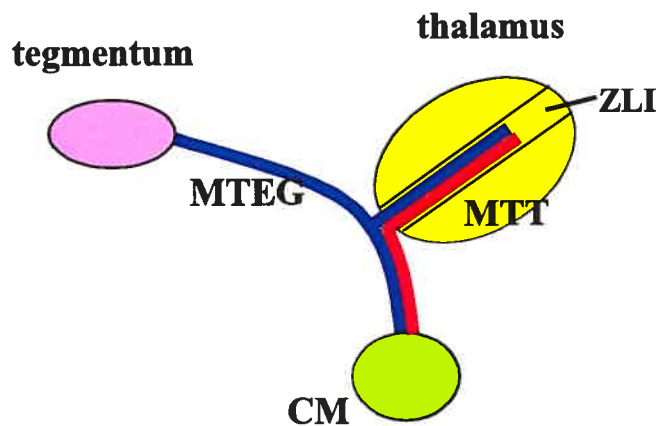


Figure 11: Les deux faisceaux efférents majeurs émergeant du CM. Le MTEG apparaît vers le stade E10.5 chez la souris et le MTT apparaît plus tardivement vers le stade E17.5.
zli : zona limitans intrathalamica

Un autre facteur de transcription, FOXB1, est aussi impliqué dans la formation du MTT (Alvarez-Bolado et al. 2000). *Foxb1* est exprimé dans les CMs et dans un domaine dorsal du thalamus (Alvarez-Bolado et al. 2000). Chez les mutants *Foxb1* les axones formant le MTT sont générés mais ne réussissent pas à atteindre leur cible et après la naissance, le MTT n'est plus détectable chez ces souris (Alvarez-Bolado et al. 2000). Toutefois, les cellules des CMs sont générées et se différencient. Un phénomène de mort cellulaire est décelé dans les CMs des mutants *Foxb1* à partir du stade E18.5 (Alvarez-Bolado et al. 2000). Cette perte cellulaire pourrait résulter d'une déficience d'apport en facteurs trophiques secondaire à l'absence de connections avec les cibles thalamiques (Alvarez-Bolado et al. 2000).

Les pré-requis dans la formation du MTT semblent donc très complexes puisque les signaux contrôlés par *Foxb1* et *Pax6* sont produits par des régions voisines mais distinctes du thalamus en développement.

Les CMs ne se forment pas chez les souris mutantes pour le facteur à boîte homéo NKX2.1 (Kimura et al. 1996). L'absence du CM résulte en l'absence du MTT et MTEG. De plus, la région médiane de l'hypothalamus est fusionnée au niveau de la ligne médiane ce qui se traduit par l'absence du troisième ventricule. *Nkx2.1* est exprimé au stade E9.5 dans le neuroépithélium qui donnera les régions ventrales de l'hypothalamus en développement y compris les CMs. L'expression précoce de ce gène ainsi que sa localisation et les effets d'une mutation à son endroit suggèrent que ce facteur est possiblement un régulateur important dans la formation des noyaux de la région ventrale de l'hypothalamus.

Chapitre 1 : Section 3

3.1 SIM1 et SIM2 sont des facteurs de transcription bHLH-PAS

SIM1 et SIM2 sont des protéines appartenant à une famille de facteurs de transcription caractérisés par trois domaines distincts: le domaine basique (b), le domaine Hélice-Boucle-Hélice (HLH de l'anglais *helix-loop-helix*) et le domaine PAS (nommé ainsi pour les premières protéines dans lesquelles ce motif a été identifié: PER, ARNT et SIM) (figure 12). Le domaine basique, généralement situé à la portion N-terminale est utilisé par ces protéines pour la liaison à l'ADN. Dans le cas des gènes *Sim*, ce domaine reconnaît une séquence consensus, 5'CANNTG3' (Probst et al. 1997 ; Moffet et al. 1997 ; Moffet & Pelletier, 2000 ; Woods & Whitelaw, 2002). Le domaine HLH constitue une interface de dimérisation. Il est situé du côté N-terminal entre le domaine basique et la région PAS. Cette dernière est définie comme une région d'environ 260 à 310 acides aminés contenant deux séquences dégénérées d'environ 50 acides aminés nommées PAS-A et PAS-B (Crews et al. 1988). Cette région, de concert avec le domaine HLH, confère une spécificité pour la dimérisation des protéines PAS et pourrait permettre la liaison de petites molécules (Dolwick et al. 1993a-b) ainsi que l'interaction avec d'autres protéines (Zelzer & Shilo, 2000). La région C-terminale aux domaines PAS possède généralement une activité transcriptionnelle de répression ou d'activation.

SIM1 code un polypeptide de 765 acides aminés ayant une masse moléculaire de 87 kDa tandis que SIM2 code un polypeptide de 657 acides aminés ayant une masse moléculaire de 75 kDa (Ema et al. 1996). Leur séquence en acides aminés est très similaire.

SIM1 et SIM2 ont environ 90% d'identité au niveau de leur domaine N-terminal (bHLH et PAS). (figure 12). Cependant aucune homologie significative n'a été recensée au niveau de la région C-terminale aux domaines PAS. Cette divergence de structure suppose des fonctions différentes de ces deux protéines.

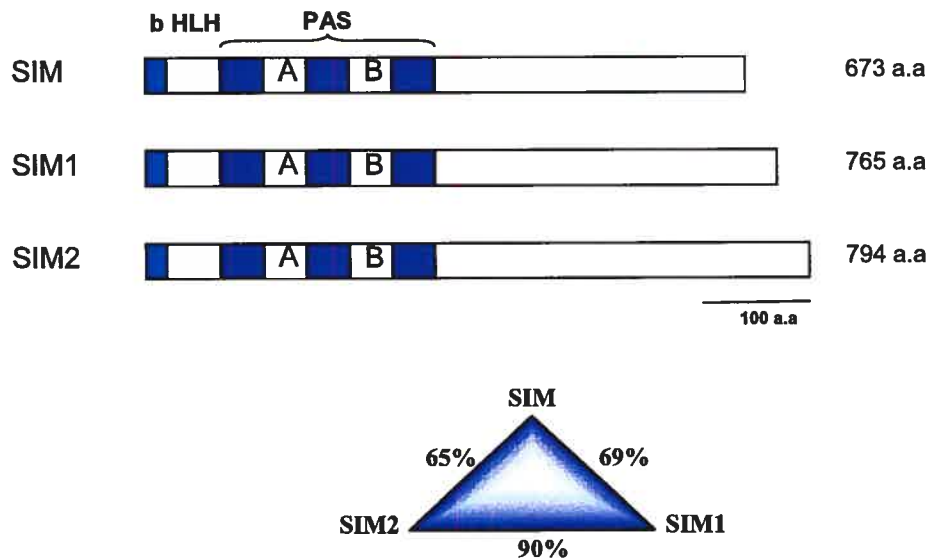


Figure 12: Organisation des domaines chez SIM, SIM1 et SIM2 ainsi que le rapport d'identité entre eux au niveau du domaine N-terminal (bHLH-PAS)

3.2 Fonctions transcriptionnelles de Sim1 et Sim2

SIM1 et SIM2 font partis d'un groupe de protéines bHLH-PAS dont la fonction requiert une hétérodimérisation avec d'autres protéines bHLH-PAS. Nous connaissons quatre protéines bHLH-PAS qui peuvent agir comme partenaires de dimérisation: ARNT (Hoffman et al. 1991), ARNT2 (Hirose et al. 1996), BMAL1 (Hogenesch et al. 1997) et BMAL2 (Hogenesch et al 2000). SIM1 peut physiquement interagir avec ARNT, ARNT2 et BMAL1 (Michaud et al. 2000) tandis que SIM2 peut interagir avec ARNT et ARNT2

(Ema et al. 1996 ; Moffet et al. 1997 ; Moffet & Pelletier, 2000 ; Woods & Whitelaw, 2002). La capacité de SIM1 et SIM2 à interagir avec les autres partenaires d'interaction n'a pas encore été rapportée dans la littérature.

Dans le contexte d'un système de transfection cellulaire, SIM1 et SIM2 peuvent interagir avec la séquence 5'G/ATACGTGA3' qui correspond à la séquence cible de *sim* chez la *Drosophile*. L'hétérodimère SIM1/ARNT active la transcription d'un gène rapporteur via sa liaison à cette séquence alors que le complexe SIM2/ARNT en réprime la transcription. SIM1/ARNT active la transcription via la région C-terminale de ARNT et non pas celle de SIM1. En soi, SIM1 n'aurait pas d'activité transcriptionnelle. Par contre, la répression par SIM2/ARNT est due au domaine C-terminale de SIM2 (Moffet & Pelletier, 2000).

3.3 Patron d'expression de *Sim1* et *Sim2*

SIM1 et SIM2 sont partiellement exprimés dans deux domaines distincts du cerveau en développement (Fan et al. 1996) (figure 13). Premièrement, *Sim1* et *Sim2* sont exprimés dans un domaine correspondant à l'hypothalamus antérieur qui inclut le noyau paraventriculaire (PVN). L'expression de *Sim2* dans ce domaine est faible et transitoire (Goshu et al. 2002). Deuxièmement, *Sim1* et *Sim2* sont exprimés dans des domaines se chevauchant qui incluent 3 régions: la zona limitans intrathalamica (ZLI) située à la frontière du thalamus dorsal et ventral, les CMS, et le mésencéphale ventral (Mes) (figure 13). *Sim2* est aussi exprimé au niveau du cortex cérébral à partir du stade E16.5.

Sim1 et *Sim2* sont aussi retrouvés dans d'autres régions extra-cérébrales. L'expression de *Sim1* est détectée dans la moelle épinière, la colonne vertébrale, le mésenchyme de la tête et les tubules rénales (Fan et al. 1996). On détecte *Sim2* dans le palais, l'épithélium de la bouche et de la langue, dans les os mandibulaires et hyoïdes ainsi qu'au niveau des vertèbres, de certains muscles squelettiques, des poumons et des tubules rénales (Ema et al. 1996; Fan et al. 1996).

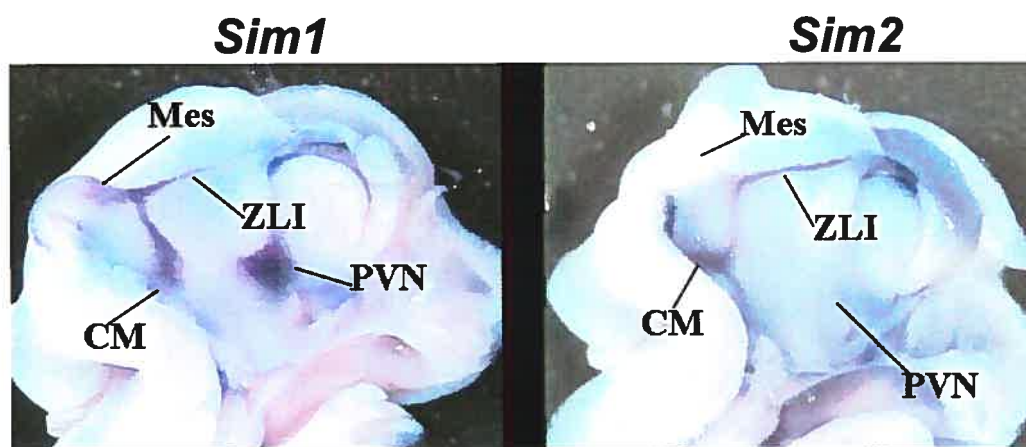


Figure 13: Domaines d'expression de *Sim1* et *Sim2* dans le cerveau d'embryons de souris au stade E12.5. Hybridation *in toto* de têtes sectionnées sur la ligne médiane. L'expression de *Sim2* dans l'hypothalamus antérieur n'est pas détectable par hybridation *in toto*. PVN: noyau paraventriculaire, ZLI: zona limitans intrathalamica, CM: corps mammillaire, Mes: mésencéphale.

3.4 *Sim1* et *Sim2* contrôlent la différenciation de cellules neuroendocrines

Le noyau paraventriculaire (PVN) régule des processus physiologiques critiques comme l'équilibre énergétique et la pression artérielle, via des projections à l'hypophyse et

d'un domaine ectopique d'expression de certains marqueurs suggère que ces cellules migrent au-delà du PVN et acquièrent une nouvelle identité (observation non-publiée).

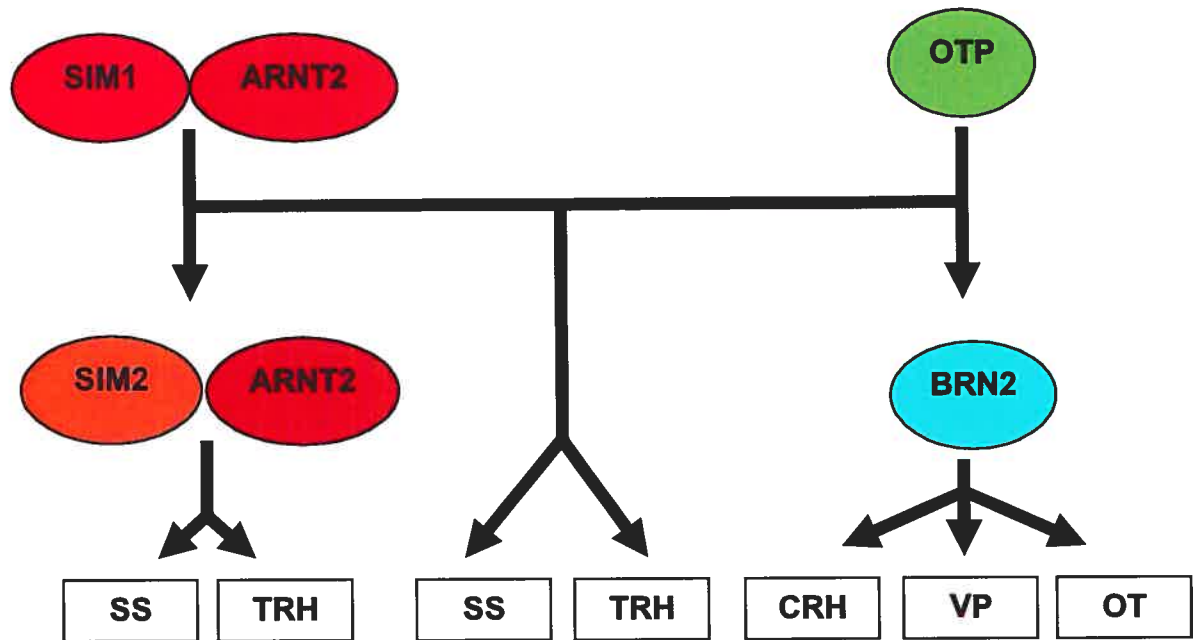


Figure 14: *Sim1* contrôle la différenciation de lignées cellulaires neuroendocrines situées dans l'hypothalamus. SS : somatostatine, TRH : thyrotropine, CRH : Corticotropine, VP : vasopressine, OT : ocytocine.

Comme il a été mentionné précédemment, SIM1 doit hétérodimériser avec un partenaire bHLH-PAS pour fonctionner. Michaud et al ont démontré à l'aide d'études de co-immunoprécipitation que SIM1 pouvait former un complexe avec ARNT2 (Michaud et al. 2000). SIM1 et ARNT2 sont coexprimés dans le PVN en développement. De plus, le PVN de souris homozygotes pour un allèle nul de ARNT2 ne se développe pas. Une analyse de marqueurs suggère que SIM1 et ARNT2 agissent au même stade du développement. (Michaud et al. 1998; Hosoya et al. 2001) (figure 14).

Les mêmes défauts hypothalamiques sont aussi retrouvés chez des souris homozygotes pour un allèle nul du gène codant le facteur de transcription à homéodomaine OTP. Ces souris meurent rapidement après leur naissance et ont des problèmes développementaux importants du système neuroendocrinien telles une migration cellulaire réduite et anormale ainsi qu'une incapacité de terminer la différenciation des neurones parvocellulaires et magnocellulaires du PVN. (Acampora et al. 1999 ; Wang et al. 2000). *Otp* est requis pour la différenciation des précurseurs neuronaux du PVN, mais aussi pour la prolifération de ceux-ci (Acampora et al. 1999). *Sim1* et *Otp* fonctionnent le long de voies parallèles étant tous deux nécessaire pour maintenir l'expression du facteur de transcription à domaine POU , BRN2 (Schonemann et al. 1995 ; Nakai et al. 1995). *Brn2* contrôle la différenciation de cellules produisant la CRH, la VP et l'OT.

Tout récemment, dans le cadre d'un travail de collaboration, nous avons montré que *Sim2* régissait aussi l'établissement de certains types cellulaires. Le PVN des souris mutantes pour *Sim2* est histologiquement identique à celui des souris sauvages. (Goshu et al. 2002). Nous avons vérifié l'intégrité du PVN par une analyse de marqueurs. Cinq types cellulaires identifiables par la production de CRH, la VP, l'OT, la SS et la TRH, étaient présents au sein de l'hypothalamus antérieur chez les souris mutantes pour *Sim2* (Goshu et al. 2004). Une analyse quantitative a montré une diminution du nombre de cellules exprimant la TRH et la SS de 43% et 83% respectivement. Cette observation démontre que *Sim2* est nécessaire au développement de cellules exprimant *Trh* et *Ss* dans l'hypothalamus antérieur.

Chez les souris *Sim2*^{+/-} il y avait une diminution des cellules produisant *Trh* et *Ss* par rapport aux souris normales. Les cellules positives pour *Trh* étaient réduites de 22% comparativement à 53% pour celles positives pour *Ss*. Il n'y a pas de réduction du nombre de cellules *Trh* et *Ss* chez les souris *Sim1*^{+/-}. Ce résultat démontre un effet de dosage de *Sim2* sur la production des cellules produisant *Trh* et *Ss*. Si une ou deux copies de *Sim1* sont présentes chez les souris *Sim2*^{+/-} le nombre de cellules *Trh* et *Ss* demeurent le même. Cependant, chez les souris *Sim2*^{-/-}, plus on enlève de copies de *Sim1*, plus le phénotype est sévère. Ces résultats suggèrent que *Sim1* peut compenser l'absence de *Sim2*.

Par ailleurs, Goshu et al ont examiné l'expression de *Sim2* chez le mutant *Sim1* et vice versa. Ils ont observé que l'expression de *Sim2* était diminuée chez le mutant *Sim1* alors que l'expression de *Sim1* était intacte chez le mutant *Sim2* (Goshu et al. 2004). La fonction de *Sim1* est donc multiple pour le développement des cellules TRH et SS. *Sim1* agit en maintenant l'expression de *Sim2* dans une majorité de cellules. Toutefois, *Sim1* peut aussi compenser l'absence de *Sim2*, suggérant, de façon partielle, une fonction redondante.

3.5 Les souris hétérozygotes pour *Sim1* sont hyperphagiques et obèses

Les souris mutantes pour *Sim1* ne sont pas viables. Elles meurent après leur naissance présumément à cause de la déficience du PVN (Michaud et al. 1998). Par contre, les souris *Sim1*^{+/-} survivent mais sont hyperphagiques et deviennent obèses (Michaud et al. 2001). Des études histologiques faites sur ces souris ont démontré qu'au niveau du PVN, il y avait 24% moins de cellules et que la perte cellulaire ne ciblait aucune espèce spécifique

de cellules (Michaud et al. 2001). Il a été proposé que les anomalies du PVN chez les souris *Sim1^{+/-}* cause l'obésité de ces souris puisque le PVN est un régulateur critique de l'appétit.

Une translocation réciproque équilibrée interrompant *SIMI* a été identifié chez une jeune patiente de 6 ans qui présentait une obésité ainsi qu'une hyperphagie sans diminution des dépenses énergétiques (Holder et al. 2000). Quatre enfants ayant une délétion chromosomique de la région 6q16, contenant *SIMI*, souffrent eux aussi d'une obésité sévère (Gilhuis et al. 2000). L'haploinsuffisance de *Sim1* cause donc une hyperphagie et l'obésité tant chez les souris que chez l'humain.

3.6 Phénotype des souris mutantes pour *Sim2*

Les souris mutantes pour *Sim2* (*Sim2^{-/-}*) meurent dans les trois jours suivant leur naissance (Goshu et al. 2002). La cause de leur décès est probablement une insuffisance respiratoire dont l'étiologie est complexe. Les souris mutantes pour *Sim2* présentent un diaphragme beaucoup plus mince et des anomalies des côtes causant une scoliose qui, de concert, pourrait conduire à l'insuffisance respiratoire de ces souris. Les souris *Sim2^{-/-}* montrent aussi des anomalies craniofaciales caractérisées par une fissure dans le palais secondaire et des malformations au niveau de la langue et de l'os sphénoïde. (Shamblott et al. 2002).

Chez l'homme, *SIM2* est localisé sur le chromosome 21, au niveau de la région 21q22.2, qui correspond à la région critique du syndrome de Down (Muenke et al. 1995; Dahmane et al. 1995). Chez la souris, *Sim2* est localisé sur le chromosome 16 dans un

segment correspondant à la région critique du syndrome de Down. L'expression de *Sim2* est augmentée de 50% dans le cerveau des souris trisomiques pour le chromosome 16 (Vialard et al. 2000). La surexpression de *Sim2*, à l'aide d'un promoteur β -actine chez la souris, engendre un ralentissement au niveau de l'apprentissage associé à la peur et à l'emplacement spatial (Ema et al. 1999). Une deuxième équipe a utilisé un chromosome artificiel bactérien (BAC) pour surexprimer *Sim2* chez la souris (Chrast et al. 2000). Ils ont observé une diminution de l'instinct explorateur des souris due à une peur de l'environnement qui les entoure ainsi qu'une plus grande sensibilité à la douleur. Les observations faites par ces deux groupes suggèrent que la surexpression de *Sim2* pourrait contribuer au phénotype complexe du comportement des personnes atteintes du syndrome de Down (Ema et al. 1999 ; Chrast et al. 2000).

Le gène NXF codant pour une protéine de la famille des bHLH-PAS, peut réguler l'expression de Drebrin ainsi que sa propre expression en liant ARNT2 (Ooe et al. 2004). ARNT2 est aussi un partenaire de dimérisation de SIM2 et ce dernier est capable de réprimer l'expression de NXF et de Drebrin (Ooe et al. 2004). Une hypothèse sur le mode d'action de *Sim2* sur l'expression de NXF et Drebrin serait que *Sim2* lie ARNT ce qui empêche NXF d'effectuer cette liaison. Cette compétition, en présence d'une quantité importante de *Sim2*, diminue l'expression de NXF et Drebrin.

La relation entre *Sim2* et Drebrin est intéressante puisque Drebrin est requis pour le maintien de la plasticité synaptique. (Imamura et al. 1992). Ces changements dynamiques sont associés à plusieurs fonctions du cerveau comme la motivation, l'apprentissage et la

mémoire. Ooe et al. ont donc proposé que *Sim2* puisse affecter la rétroaction positive de l'expression de NXF ainsi que la régulation de l'expression de Drebrin. Une surexpression de *Sim2* diminue la production de NXF et cette diminution affecte directement la production de Drebrin (figure 15). Chez les cerveaux des souris modèles pour le syndrome de Down, où une surexpression de *Sim2* semble présente, l'expression de Drebrin est indétectable dans le cortex et on observe une atrophie de l'arbre dendritique, une atténuation de l'émergence de neurites et un dérèglement des épines dendritiques (Becker et al. 1986 ; Becker et al. 1991). Ceci représente un premier exemple de déséquilibre entre *Sim2* et un autre gène dans la pathologie du syndrome de Down.

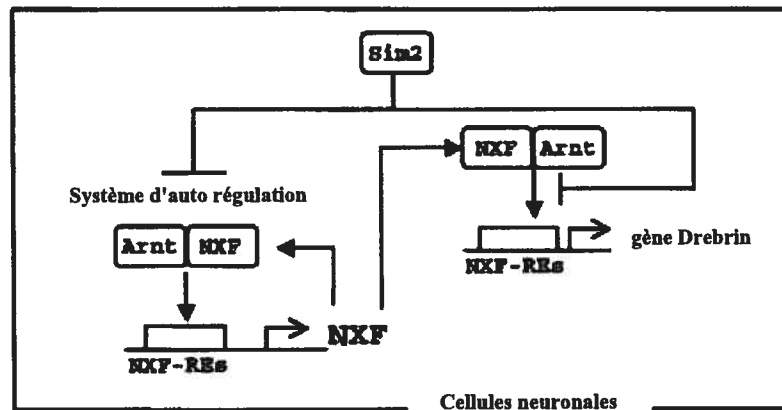


Figure 15: Modèle du mode d'action de NXF dans les cellules neuronales et sa relation avec *Sim2*. Adapté de Ooe et al. 2004, *Molecular and Cellular Biology*, 24(2) p616

3.7 *Sim* est impliqué dans le développement de la ligne médiane.

Chez la *Drosophile*, *Sim* est requis pour le développement des cellules localisées à la ligne médiane du SNC. (Nambu et al. 1991). Son expression au niveau la ligne médiane

est maintenue dans les neurones et les cellules gliales matures. Lorsque *sim* est muté chez des embryons, ces cellules acquièrent un phénotype latéral (Nambu et al. 1991). Par contre, si *sim* est exprimé de façon ubiquitaire dans des mouches transgéniques,

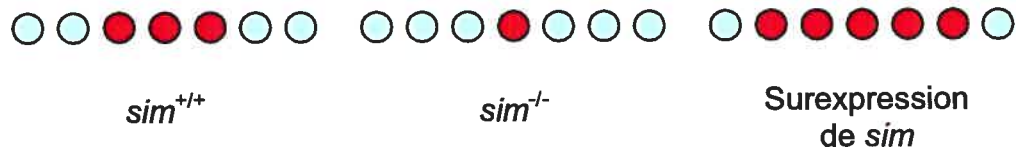


Figure 16: Effet de la mutation et surexpression de *sim* au niveau de la ligne médiane chez la Drosophile. Les cercles bleus représentent les cellules latérales et les cercles rouges les cellules médianes.

plusieurs autres cellules de la région ventro-latérale acquièrent le phénotype médian. Ces expériences indiquent que le produit du gène *sim* est nécessaire et suffisant pour la différenciation des cellules de la ligne médiane du SNC (Nambu et al. 1991). *sim* contrôle de façon directe ou indirecte l'expression d'au moins 20 gènes au cours du développement de la ligne médiane, suggérant qu'il agit comme le régulateur majeur dans le programme développemental de la ligne médiane (Crews. 1998). Un des gènes directement régulé par *sim* est le gène *slit*. Lorsqu'on examine le phénotype des axones ipsilatéraux chez les deux mutants, on remarque que les axones convergent vers la ligne médiane et ne la quitte jamais formant un seul faisceau longitudinal (Crews et al. 1988 ; Thomas et al. 1988). La convergence des axones ipsilatéraux chez ces mutants pourrait donc s'expliquer par l'absence de *sim* qui cause une mauvaise différenciation des cellules ce qui ne permet plus

aux cellules d'exprimer *slit* qui est nécessaire pour repousser les axones, les empêchant de croiser la ligne médiane.

Hypothèses et objectifs

Sim1 et *Sim2* sont deux facteurs de transcription avec une structure similaire au niveau de leur domaine N-terminal (bHLH, PAS) et très divergente dans leur domaine C-terminal. Conséquemment, il a été postulé que *Sim1* et *Sim2* jouaient des rôles différents. Cette proposition a été vérifiée *in vitro* et il a été postulé que *Sim1* est un activateur de la transcription tandis que *Sim2* est un répresseur. Cependant, Goshu et al ont récemment observé qu'*in vivo*, *Sim1* et *Sim2* pouvaient jouer des rôles similaires dans le développement du PVN.

Nous avons observé que *Sim1* et *Sim2* étaient tout deux exprimés dans la région du CM situé au niveau postérieur de l'hypothalamus. Nous avons donc examiné le CM des souris mutantes pour l'un ou l'autre des deux gènes et nous n'avons observé aucune anomalie du CM suite à une étude histologique. Nous avons remarqué que certains faisceaux mammillaire étaient affectés chez les souris mutantes pour *Sim1* et *Sim2*. Nous pensons que *Sim1* et *Sim2* sont tous deux requis pour le développement des axones du CM. Nous proposons que leur rôle serait de contrôler l'expression de molécules impliquées dans le mécanisme de la guidance axonale. Nous considérons une redondance dans les rôles joués par *Sim1* et *Sim2* dans le CM.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons mis à profit un allèle nul de *Sim1* (*Sim1^{lacZ}*) dans lequel le gène de fusion *tau-lacZ* a été introduit dans le laboratoire, permettant le marquage des axones provenant du CM. Nous allons vérifier l'effet de l'absence de ces deux gènes sur les projections efférentes du CM ainsi que sur des marqueurs du CM et des molécules impliquées dans la guidance axonale pour tenter d'établir une voie signalétique régissant le développement axonale de cette région.

Chapitre 2 : Article

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

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

Research Center, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada

Corresponding author :

Jacques L. Michaud

Research Center Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Sainte-Catherine Montréal (Québec) H3T 1C5

Phone : (514) 345-4727 Fax : (514) 345-4766

ABSTRACT

The mammillary body (MB) and its axonal projections to the thalamus (mammillothalamic tract, MTT) and tegmentum (mammillotegmental tract, MTEG) are components of an important circuit involved in spatial learning. The bHLH-PAS transcription factors SIM1 and SIM2 are co-expressed in the developing MB. Using histological and marker analysis, we have found that MB neurons are generated in embryos lacking *Sim1* (*Sim1^{-/-}:Sim2^{+/+}*), *Sim2* (*Sim1^{+/+}:Sim2^{-/-}*) or both *Sim1* and *Sim2* (*Sim1^{-/-}:Sim2^{-/-}*). However, the MTT and MTEG are absent in *Sim1^{-/-}:Sim2^{-/-}* embryos and reduced in embryos lacking *Sim1*, but bearing one or two copies of *Sim2*, indicating a contribution of the latter to the development of MB axons. We have generated, by homologous recombination, a null allele of *Sim1* (*Sim1^{tlz}*) in which the *tau-lacZ* fusion gene was introduced, allowing staining of MB axons. Consistent with the histological studies, *lacZ* staining showed that the MTT/MTEG is barely detectable in *Sim1^{tlz/tlz}:Sim2^{+/+}* and *Sim1^{tlz/tlz}:Sim2^{-/-}* brains. Moreover, we have identified in these brains another group of MB axons, not found in controls, that crosses the midline. An intermediate phenotype is observed in the MB of *Sim1^{tlz/tlz}:Sim2^{+/+}* embryos: the MTT/MTEG is clearly present, but smaller than in controls, and is accompanied by ectopic axons that cross the midline. The same patterns were observed when the MB axons were visualized with DiI. Marker analysis indicated that MB neurons differentiate appropriately and survive at least until E18.5. This analysis also showed that *Sim1* and *Sim2* act along compensatory, but not hierarchical pathways, suggesting that they play similar roles in vivo. We propose that *Sim1* and *Sim2* control the expression of molecules involved in the response of axon growth cone to guidance cues.

INTRODUCTION

The mammillary bodies (MB), which lie at the posterior margin of the hypothalamus, are composed of the lateral and medial mammillary nuclei. The MB participate in two pathways that are essential for processing of spatial information (reviewed in Vann and Aggleton, 2004). First, this function of the MB involves a circuit composed of a major input from the hippocampus to the MB, via the fornix, and of MB projections to various areas of the anterior thalamus, via the mammillothalamic tract (MTT) (Van der Kooy et al., 1978; Cruce, 1977; Hayakawa and Zyo, 1989; Allen and Hopkins, 1990). The MB thus link two brain regions that are critical for episodic memory. Second, the lateral mammillary nucleus, but not its medial neighbour, contains head direction cells that aid navigation by firing selectively when an animal is facing in a specific direction in the horizontal plane (Vann and Aggleton, 2003). Reciprocal loops connect the MB and some tegmental centers, including the nuclei of Gudden, the nucleus reticularis tegmenti pontis and the medial pontine nucleus (Sharp et al., 2001). MB axons projecting to the tegmental nuclei form the mammillotegmental tract (MTEG). The lateral mammillary nucleus is probably important for transforming the vestibular information provided by the tegmentum to help signal head direction. It has been suggested that the head direction cells are responsible for the spatial memory function of the MB. However, lesions involving both lateral and the medial nuclei result in more severe learning defect than those restricted to the lateral nuclei, suggesting that the medial nuclei also contribute to spatial memory process.

Most MB neurons send axonal projections to both the anterior thalamic nuclei and the tegmentum, respectively via the MTT and the MTEG. The MTEG is one of the earliest tracts to develop in the CNS, appearing at about E10.5 (Easter, Jr. et al., 1993; Mastick and Easter, Jr., 1996). Much later, at about E17.5, each axon of the MTEG generates collateral that will contribute to the formation of the MTT (Alvarez-Bolado et al., 2000; Valverde et al., 2000). A minority of MB neurons appear to contribute only to the MTT (Hayakawa and Zyo, 1989). MTT axons are induced near the boundary between the dorsal and ventral thalami. Recent observations indicate that this region produces signals that induce and/or guide MTT axons. Some of these signals are under the control of the transcription factors PAX6 and FOXB1 (Valverde et al., 2000; Alvarez-Bolado et al., 2000). Both *Pax6* and *Foxb1* mutant mice are born with an intact MTEG but without a MTT. In *Foxb1* embryos, MTT axons are induced but do not grow into the thalamus whereas branching does not occur at all in *Pax6* mutants. PAX6 is produced in a domain surrounding the MTEG at the level of the bifurcation as well as along the dorsal border of the ventral thalamus. *Foxb1* is expressed along the ventral border of the dorsal thalamus but also in the MB. Chimera analysis, however, indicates that *Foxb1* functions in the thalamus to promote MTT formation. The requirements for MTT axon guidance are thus complex, since the signals controlled by *Pax6* and *Foxb1* are produced by closely located but non-overlapping regions of the thalamus.

Signals controlling the early development of the MB have also been identified. For instance, signals produced by axial structures are required to specify cell types in the

ventromedial hypothalamus. Extrapolation from birth dating studies performed in rats suggests that MB neurons are born between E10 and E13 in mice. *Nkx2.1* is expressed as early as E9.5 in the neuroepithelium that will give rise to ventral regions of the developing hypothalamus, including the MB (Pabst et al., 2000). Its expression in the prospective ventral hypothalamus is induced by *Shh* with the cooperation of *Bmp7* which are both expressed in the underlying axial mesoderm and in ventromedial cells of the developing hypothalamus (Kimura et al., 1996;Ericson et al., 1995;Pabst et al., 2000). The MB and several ventromedial nuclei of the hypothalamus do not develop in embryos with a loss of *Nkx2.1* (Marin et al., 2002). The early expression of *Nkx2.1* in a large domain of the ventral hypothalamus and the fact that its loss affects several nuclei suggest that it is required to specify the whole ventral hypothalamic anlage.

The bHLH-PAS transcription factor SIM1 and SIM2 are closely related paralogs which expression overlaps in two regions of the hypothalamus (Fan et al., 1996). First, *Sim1* and *Sim2* are expressed in the developing paraventricular nucleus (PVN), which is located in the anterior hypothalamus. *Sim1* is required for the differentiation of virtually all neurons of the PVN (Michaud et al., 1998) whereas *Sim2* controls the differentiation of a subset of these PVN neurons (Goshu et al., 2004). Second, *Sim1* and *Sim2* are expressed as early as E9.5 in the prospective MB. The function of these genes during development of MB has not yet been elucidated. SIM1 and SIM2 belong to a group of proteins that need to heterodimerize with members of another group of bHLH-PAS proteins for which there are only four representatives yet characterized: ARNT (Hoffman et al., 1991), ARNT2 (Hirose

et al., 1996), BMAL1/MOP3 (Hogenesch et al., 1997;Ikeda and Nomura, 1997;Takahata et al., 1998;Wolting and McGlade, 1998;Ikeda and Nomura, 1997;Takahata et al., 1998;Wolting and McGlade, 1998) and BMAL2/MOP9 (Hogenesch et al., 2000;Maemura et al., 2000;Okano et al., 2001;Ikeda et al., 2000;Maemura et al., 2000;Okano et al., 2001;Ikeda et al., 2000). Biochemical, expression and mutant analyses indicate that ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1, and presumably SIM2, for PVN development (Michaud et al., 2000;Hosoya et al., 2001;Keith et al., 2001).

Here, we show that MB neurons are generated but do not develop MTEG and MTT in embryos lacking both *Sim1* and *Sim2*. Instead, axons aberrantly cross the midline. The same abnormalities, although less severe, are observed in embryos with 2 or 3 copies of the *Sim1/Sim2* genes. Expression studies indicate that *Sim1* and *Sim2* function along compensatory, but not hierarchical pathways, suggesting that, *in vivo*, these genes play the same roles. We propose that *Sim1* and *Sim2* act upstream of an axons guidance molecule that is required either for attraction of MB axons dorsally or for their repulsion from the midline.

MATERIAL AND METHODS

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

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

Homologous recombinant ES cell clones were microinjected into C57BL/6 blastocysts to produce chimeric mice. The resulting male chimeras were backcrossed to C57BL/6 females.

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

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

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

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

All the analyses were done on at least two different embryos of the same stage and with the same genotype. For histology, embryo and newborn brains were fixed in Carnoy's fluid, embedded in paraffin, sectioned at 6 μ m and stained with hematoxylin. In situ hybridization was performed either on paraffin sections or on whole mount brains, as previously described (Michaud et al., 1998). The following probes were generous gifts of the following colleagues: *Foxb1* (P. Lebowski); *Nkx2.1* (J. Rubenstein); *Robo1*, *Robo2*, *Slit1*, *Slit2* and *Slit3* (M. Tessier-Lavigne). Probes for *Lhx1* and *Lhx5* were generated by RTPCR. *Sim1* and *Sim2* probes were previously described (Fan et al., 1996). Whole brains stained for β -galactosidase activity were sectioned at 100 μ m with a vibratome. DiI crystals (Molecular Probes Inc.) were inserted in the MB of E14.5 brains fixed with 4% paraformaldehyde. These brains were incubated in paraformaldehyde for one week at room temperature and then sectioned at 100 μ m.

RESULTS

Loss of Sim1/Sim2 function affects the development of MB projections.

Previous studies have shown that *Sim1* and *Sim2* start to be expressed in the neuroepithelium that will give rise to the MB at E9.5, before the birth of their first neurons (Fan et al., 1996). We performed a detailed comparison of their expression patterns in the prospective MB at latter stages because such description was lacking. At E10.5, *Sim1* is strongly expressed in the mantle layer, which contains the first born MB neurons, and at weaker levels in the ventricular layer (Fig. 1A). At that stage, *Sim2* is co-expressed with *Sim1* in the ventricular layer whereas its expression in the mantle layer is much weaker (Fig. 1B). At E11.5 and E12.5, *Sim1* is mainly expressed in the whole mantle layer containing the prospective MB and more discretely in the adjacent ventricular zone. In contrast, *Sim2* transcripts are found in abundance in the ventricular zone and in the medial aspect of the mantle layer (Fig. 2C-F). At these stages, *Sim1* and *Sim2* are thus co-expressed in the ventricular layer and in the medial aspect of the mantle layer, which presumably contains neurons of latter generations. At E14.5, *Sim1* shows the same expression pattern whereas *Sim2* expression becomes weak and restricted to the ventricular layer (2 G,H). At E18.5, *Sim1* is expressed in the medial and lateral mammillary nuclei but we could not detect *Sim2* expression in the MB (not shown). Therefore, *Sim1* and *Sim2* are co-expressed in post-mitotic cells of the MB only during a short period, before E14.5, since *Sim2* expression in the mantle zone is transient whereas that of *Sim1* is continuous.

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

ARNT2, the bHLH-PAS dimerizing partner of SIM1 and presumably of SIM2 for PVN development, is expressed extensively in the CNS, including in the developing MB (not shown). We determined whether ARNT2 acts as a dimerizing partner of SIM1 and SIM2 for MB axonal development by comparing histologically the brains of E18.5 wild-type and *C112k* homozygous embryos, which carry a microdeletion encompassing the *Arnt2* locus (Michaud et al., 2000). Surprisingly, we found that the MTT and MTEG are intact in these *C112k* mutants, suggesting that another dimerizing partner interacts with SIM1 and SIM2 for MB axonal development (data not shown).

Creation of a *tlacz* allele

In order to further characterize the axonal projections originating from *Sim1* expressing cells, we generated a new targeted allele of *Sim1* (*Sim1^{tlz}*) in which the initiation codon, the basic and the HLH domains were replaced by a *Tau-lacZ* fusion gene (Fig. 4A). The targeted region overlaps with that of the initial *Sim1* mutant allele (*Sim1⁻*), in which the initiation codon and the basic domain were deleted. This *Sim1^{tlz}* allele, predicted to be a null, would allow us to stain the MB axons that express *Sim1* and follow their fate in the context of a decrease of *Sim1* and/or *Sim2*. Using a double selection strategy, we obtained 12/140 (9 %) ES clones in which the *Sim1* locus underwent homologous recombination. One of these clones was used to generate a male chimera which was crossed to a C57Bl/6 female, resulting in germline transmission of the targeted allele (Fig. 4B). Mice homozygous for this allele show the same phenotypes as those described in mice with the previously described *Sim1⁻* allele: *Sim1^{tlz/tlz}* mice die shortly after birth with a severe defect of the paraventricular nucleus and the *Sim1^{tlz/+}* mice are hyperphagic (data not shown). Also, the pattern of lacZ staining in the brain of *Sim1^{tlz/+}* embryos and newborn mice was comparable to the distribution of *Sim1* transcript (for instance, compare 1C and 7A; 1G and 5F,K). Finally, histological analysis showed that the MB of newborn *Sim1^{tlz/tlz};Sim2^{-/-}* mice is preserved whereas its MTT and PMT are not detectable (Fig. 4C,D). All together, these results indicate that the *Sim1^{tlz}* allele is suitable to study the impact of *Sim1* function during MB development.

MB axons aberrantly cross the midline in *Sim1/Sim2* deficient embryos.

We next stained E14.5 brains with variable dosage of the *Sim1^{tlz}* and *Sim2⁻* alleles for β -galactosidase activity (Fig. 5). The PMTs of *Sim1^{tlz/+};**Sim2^{+/-}* and *Sim1^{tlz/+};**Sim2^{-/-}* brains are clearly recognizable and their sizes are comparable. At the level of the anterior MB, the PMT bundle progresses in a domain dorsal to the MB that expresses the tau-LacZ fusion protein. Anteriorly, only one bundle of MB axons appears to develop whereas more posteriorly, several bundles merge to form the main PMT bundle before it leaves the MB domain. In contrast, the PMT is greatly reduced in *Sim1^{tlz/tlz};**Sim2^{+/+}* brains. At the most posterior aspect of the MB, a bundle presumably corresponding to the PMT is recognizable but is accompanied by additional axons, originating more laterally, which project towards the midline and become splayed on their way to reach it. These findings are more striking in *Sim1^{tlz/tlz};**Sim2^{+/-}* and *Sim1^{tlz/tlz};**Sim2^{-/-}* brains in which a PMT is barely recognizable and a group of axons similar to that observed in *Sim1^{tlz/tlz};**Sim2^{+/+}* brains but more prominent is found. At the most posterior level of the MB, these axons cross the midline ventrocaudally to the third ventricle. In embryos lacking at least two copies of *Sim1*, the number of bundles arising in the MB appears somewhat decreased. Of note, we did not observe consistent changes of *tau-lacz* expression according to the different genotypes in the region located dorsally to the MB, in which PMT axons progress.

No difference between the pattern of *lacZ* staining of axonal projections found in genetic compounds for the *Sim1⁻* and *Sim1^{tlz}* alleles versus those of homozygotes was detected, consistent with the assumption that the *tau-lacz* fusion gene does not generally

affect axon development in mice (data not shown). In order to further validate the use of the *Sim1^{tlz}* allele to label MB axons, we inserted crystals of DiI into the MB of E14.5 *Sim1^{tlz/+}:Sim2^{+/+}* and *Sim1^{tlz/-}:Sim2^{-/-}* embryos and compared their pattern of axonal projections. The PMT was clearly labeled in control embryos and very rare axons could be seen progressing towards the midline (Fig. 6 A,B). In contrast, most MB axons are directed towards the midline in *Sim1^{tlz/-}:Sim2^{-/-}* embryos. The axons became splayed as they reached the midline but a subset of these form a bundle crossing the midline ventrally (Fig. 6 C,D). This pattern is similar to that observed with the *Sim1^{tlz}* allele, indicating that the latter is expressed in most MB axons and again supporting our conclusion that its expression *per se* does not affect MB axons development.

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

Loss of Sim1/Sim2 affects Foxb1 expression in the MB.

The MB appears histologically intact in *Sim1/Sim2* double mutants. In order to determine whether *Sim1/Sim2* affects the differentiation of the MB, we performed marker analysis. The *Sim1* mutant allele is a null but does not interfere with the production and the stability of its transcript, which can be used to follow the fate of *Sim1* mutant cells (Michaud et al., 1998). We found that the expression of the *Sim1* mutant transcript in the MB of E12.5 and E18.5 *Sim1^{-/-}:Sim2^{-/-}* embryos is comparable to that of controls, consistent with the fact that the production of the *Tau-lacZ* fusion protein is maintained in the MB of mutant embryos (Fig. 8 A,B and 9 A,B). Similarly, we found that *Lhx1* and *Nkx2.1* expression are maintained in the MB of E12.5 and E18.5 double mutants (Fig. 8 C-F; 9 C,D and data not shown). Since *Lhx1* and *Nkx2.1* are expressed in virtually all MB cells, the loss of *Sim1* and *Sim2* thus does not seem to affect the generation and survival of postmitotic neurons in the developing MB. In contrast, *Foxb1* expression is dramatically decreased in the prospective MB and in the dorsal domain of *Sim1^{-/-}:Sim2^{-/-}* embryos, but not in those of embryos with at least one allele of *Sim1/Sim2*, indicating that *Sim1/Sim2* acts upstream of *Foxb1* (Fig. 8 G,H and 9 E-H). Of note, the expression of *Sim1*, *Lhx1* and *Nkx2.1* is also maintained in a domain dorsal to the E12.5 MB in which the PMT progresses.

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

Sim1 and *Sim2* function along compensatory but not hierarchical pathways during MB development.

DISCUSSION

The loss of *Sim1/Sim2* produces a complex axonal phenotype that is characterized by severe hypodevelopment of the PMT and the presence of axons directed towards the midline or crossing it. The severity of these two features increases progressively with the greater dosage of *Sim1/Sim2* mutant alleles, the size of the PMT diminish and the number of abnormally-oriented axons increases concomitantly. The overall number of MB axons might be reduced in the *Sim1/Sim2* double mutant since the bundles of axons that approach or cross the midline are not as developed as the normal MB axonal tracts. However, the fact that the mutant axons are splayed makes such a comparison difficult.

Requirement of Sim1 and Sim2 for MB axonal guidance

Axonal growth cones are submitted to the influence of attractive and repulsive signals that guide their progression in the developing brain (reviewed in (Giger and Kolodkin, 2001)). Over the last decade, several molecular systems have been involved in the guidance of axons, typically with a receptor expressed at the surface of the growth cone and a ligand produced by its environment. One possibility to account for the axonal defect observed in *Sim1/Sim2* mutants is that these genes function cell autonomously to regulate

the expression of receptors responsive to attracting and/or repulsive signals. For instance, downregulation of a receptor that mediates the attraction of MB axons towards dorsal signals could cause the defects reported here. By default, these axons could then be influenced by an attractive signal produced by the midline. Alternatively, a receptor responsive to a repulsive signal produced by the midline could be downregulated allowing the MB axons to cross contralaterally. It should be underlined that a loss or a gain of responsiveness of MB mutant axons to a midline signal cannot explain the early defect of axonal guidance observed at E11.5. At that stage, mutant axons do not form clearly recognizable bundles and there is not yet axons directed towards the midline, suggesting that such attraction is a late event.

Interestingly, there are, in fact, some evidences suggesting that repulsive signals are produced by the midline of the ventral hypothalamus. For instance, SLIT2, a secreted molecule that induces repulsion of axons that express its ligand ROBO, is produced in the ventral portion of the ventricular layer of the hypothalamus. Dopaminergic axons, which normally progress longitudinally, are attracted by the ventral midline of the hypothalamus in *Slit2* mutant embryos (Bagri et al., 2002). A similar phenotype is observed in *Nkx2.1* mutant embryos, one study showing that dopaminergic axons actually cross the midline in the ventral part of the caudal hypothalamus (Marin et al., 2002; Kawano et al., 2003). *Slit2* expression in the ventral hypothalamus is downregulated in these mutants, suggesting that the decrease of this factor causes the abnormal axonal targeting. Interestingly, *Slit* expression in the CNS midline cells of the fly embryo is directly controlled by *sim*, a

homolog of *Sim1* and *Sim2*. In order to explore the possibility that such an interaction has been conserved in vertebrates, we have examined the expression of *Slit1*, *Slit2*, *Slit3*, *Robo1* and *Robo2* in the MB of E11.5 wild-type and *Sim1/Sim2* mutant embryos (not shown). We have found that, with the exception of *Slit3*, all of these genes are expressed in the prospective MB and/or in its surrounding areas. However, their expression is not changed in the double mutants, indicating that this molecular system is not involved in the genesis of the phenotype.

An alternative model would be that *Sim1* and *Sim2* are required in the environment in which the MB axons progress to control the expression of an attractive signal. Indeed, *Sim1* is expressed in a domain dorsal to the MB, which contains the PMT from the time of its appearance. Before E11.5, *Sim1* and *Sim2* expression overlaps extensively in a region of the ventricular layer that presumably gives rise to MB and the dorsal domain. At later stages, they are co-expressed in the lateral ventricular layer and in the medial aspect of the mantle layer of the prospective MB but do not overlap in the dorsal domain. If *Sim1* and *Sim2* are indeed required in the dorsal domain for correct development of MB axons, one would have to postulate that they function at an early stage in precursors of cells of the dorsal domain. The fact that *Foxb1* expression in this domain is downregulated in the *Sim1/Sim2* double mutant, but not in *Sim1^{-/-}:Sim2^{+/+}* embryos, would suggest that *Sim2* can influence the fate of these dorsal cells. Explant studies, in which MB and the surrounding regions from mutant and/or wild-type embryos are co-cultured, could provide insight into

this possibility. Finally, *Sim1* could function in both the MB and in the surrounding tissues, as it was shown for the transcription factor *lola* in the developing fly (Crowner et al., 2002).

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

Cascade of transcription factors controlling MB development

Our marker analysis indicates that *Sim1* and *Sim2* are not required for the generation and initial differentiation of MB neurons, since the expression of all the markers studied, with the exception of *Foxb1*, is detectable in *Sim1/Sim2* double mutant until E18.5. The loss of *Foxb1*, however, would suggest that *Sim1* and *Sim2* might be required to control aspects of MB differentiation other than axonal targeting that were not revealed by our analysis. The fate of these mutant neurons also remains an open question that is cannot be readily resolved in view of the perinatal lethality resulting from the loss of *Sim1* or *Sim2*. It is possible that they will eventually undergo apoptosis in the absence of correct targeting, as it was shown in *Foxb1* mutant mice (Alvarez-Bolado et al., 2000).

Histological and marker studies have shown that the MB and its axonal tracts are absent in *Nkx2.1* mutant embryos (Marin et al., 2002). *Nkx2.1* does not however selectively affect MB development since other ventrocaudal hypothalamic nuclei are disrupted in this mutant. The fact that the MB domain of *Sim1* expression is dramatically reduced in *Nkx2.1* mutant embryos as early as E11.5 indicate that *Nkx2.1* functions upstream of *Sim1* for MB development (Marin et al., 2002). Consistent with this conclusion is our observation that *Nkx2.1* expression is not affected by the loss of both *Sim1* and *Sim2*. Of note, *Sim1* expression domain in the anterior hypothalamus, which includes the prospective PVN, is expanded ventrally in E11.5 *Nkx2.1* mutant embryos. Similarly, *Sim1* expression is repressed by *Nkx2.2*, a close homolog of *Nkx2.1*, in the developing ventral spinal cord. *Nkx2.1* and *Nkx2.2* thus regulate *Sim1* expression differentially depending of the regions of the CNS.

Respective functions of bHLH-PAS proteins during MB development

The basic, HLH and PAS domains of SIM1 and SIM2 share high identity whereas their carboxy-terminal domains are poorly conserved. Consistent with the low identity of their carboxy-termini, SIM1 and SIM2 display distinct transcriptional properties in cultured cell system. The SIM1:ARNT(2) heterodimer transactivates reporter constructs via the ARNT carboxy-terminus (Moffett and Pelletier, 2000; Woods and Whitelaw, 2002). SIM1 does not have neither activation nor repression activity in this context. In contrast, SIM2:ARNT(2) does not activate transcription unless the carboxy-terminus of SIM2 is

deleted. The carboxy-terminus of SIM2 appears to have a repressive function, which quenches the transactivating of ARNT (Moffett and Pelletier, 2000). Since SIM1 and SIM2 compete for binding to ARNT(2) and to the DNA binding site, these different properties of SIM1 and SIM2 result in some transcriptional antagonism at least *in vitro* (Moffett and Pelletier, 2000; Woods and Whitelaw, 2002).

Our study indicates, however, that *Sim1* and *Sim2* can compensate for the absence of each other, the former playing a predominant role over the latter during MB development. We did not observe reduction of *Sim2* expression in the MB of *Sim1*^{-/-} embryos and vice-versa, suggesting that the interaction between *Sim1* and *Sim2* is not hierarchical, nor parallel. All together, these results indicate that *Sim1* and *Sim2* can play similar role *in vivo*, even though their C-termini have diverged considerably. There are other lines of evidence supporting this conclusion. Overexpression of *Sim1* or *Sim2* under the control of a *Wnt1* enhancer activates *Shh* expression in the mouse midbrain, demonstrating that *Sim1* and *Sim2* can act similarly in a given embryonic context (Epstein et al., 2000). Moreover, *Sim1* can compensate for the absence of *Sim2*, albeit ineffectively, during differentiation of the PVN. The interplay between *Sim1* and *Sim2* is, however, complex in the developing PVN since mutant analysis indicates that they also control different aspects of PVN neuronal differentiation and that *Sim1* is required for *Sim2* expression (Goshu et al., 2004).

Biochemical, expression and mutant studies indicate that ARNT2 is required for PVN development by acting as the dimerizing partner of SIM1. It appears likely that SIM2 also heterodimerizes with ARNT2 in the PVN, since they can physically interact (Goshu et al., 2004). However, because the *Arnt2* phenotype is identical to that of *Sim1*^{-/-} embryos and more severe than that of *Sim2*^{-/-} embryos, it has not been formally shown that SIM2 controls PVN neuronal differentiation through this interaction. Surprisingly, our mutant analysis indicates that ARNT2 is not required for the development of MB axonal tracts. It is possible that *Arnt* compensates for the absence of *Arnt2* but its expression level is particularly low in the developing CNS and not specifically increased in the MB. Alternatively, SIM1 and SIM2 could dimerize with a member of another subgroup of partners such as BMAL1 or BMAL2, raising the possibility that the use of different partners could influence the function of SIM1/SIM2. Such heterogeneity in the composition of the SIM1 and SIM2 complexes could account for the discrepancy between their respective *in vivo* and *in vitro* transcriptional activities.

ACKNOWLEDGEMENTS

JLM is a clinician-scientist of the CIHR. This work was supported by an operating grant from the CIHR.

REFERENCES

1. Allen GV, Hopkins DA (1990) Topography and synaptology of mamillary body projections to the mesencephalon and pons in the rat. *J Comp Neurol* 301: 214-231.
2. Alvarez-Bolado G, Zhou X, Voss AK, Thomas T, Gruss P (2000) Winged helix transcription factor Foxb1 is essential for access of mammillothalamic axons to the thalamus. *Development* 127: 1029-1038.
3. Bagri A, Marin O, Plump AS, Mak J, Pleasure SJ, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M (2002) Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron* 33: 233-248.
4. Crowner D, Madden K, Goeke S, Giniger E (2002) Lola regulates midline crossing of CNS axons in *Drosophila*. *Development* 129: 1317-1325.
5. Cruce JA (1977) An autoradiographic study of the descending connections of the mammillary nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 176: 631-644.
6. Easter SS, Jr., Ross LS, Frankfurter A (1993) Initial tract formation in the mouse brain. *J Neurosci* 13: 285-299.
7. Epstein DJ, Martinu L, Michaud JL, Losos KM, Fan C, Joyner AL (2000) Members of the bHLH-PAS family regulate Shh transcription in forebrain regions of the mouse CNS. *Development* 127: 4701-4709.
8. Ericson J, Muhr J, Placzek M, Lints T, Jessell TM, Edlund T (1995) Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 81: 747-756.
9. Fan C-M, Kuwana E, Bulfone A, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA, Crews S, Martinez S, Puelles L, Rubenstein J, Tessier-Lavigne M (1996) Expression patterns of

two murine homologs of *Drosophila Single-minded* suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Molecular and Cellular Neuroscience* 7: 1-16.

10. Giger RJ, Kolodkin AL (2001) Silencing the siren: guidance cue hierarchies at the CNS midline. *Cell* 105: 1-4.
11. Goshu E, Jin H, Lovejoy J, Marion JF, Michaud JL, Fan CM (2004) Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol Endocrinol* 18: 1251-1262.
12. Goshu E, Jin H, Marion J-F, Michaud JL, Fan C-M (2003) *Sim2* defines regional-specific neuroendocrine cell types in the anterior hypothalamus. *J Neurosci*.
13. Hayakawa T, Zyo K (1989) Retrograde double-labeling study of the mammillothalamic and the mammillotegmental projections in the rat. *J Comp Neurol* 284: 1-11.
14. Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fuji H, Saijoh Y, Gotoh O, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1996) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic Helix-Loop-Helix/PAS factor (ARNT2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). *Molecular and Cellular Biology* 16: 1706-1713.
15. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252: 954-958.
16. Hogenesch JB, Gu YZ, Moran SM, Shimomura K, Radcliffe LA, Takahashi JS, Bradfield CA (2000) The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J Neurosci* 20: RC83.

17. Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu Y-ZG, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA (1997) Characterization of a subset of the basic-Helix-Loop-Helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 272: 8581-8593.
18. Hosoya T, Oda Y, Takahashi S, Morita M, Kawauchi S, Ema M, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y (2001) Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes Cells* 6: 361-374.
19. Ikeda M, Nomura M (1997) cDNA Cloning and Tissue-Specific Expression of a Novel Basic Helix-Loop-Helix/PAS Protein (BMAL1) and Identification of Alternatively Spliced Variants with Alternative Translation Initiation Site Usage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 233: 258-264.
20. Ikeda M, Yu W, Hirai M, Ebisawa T, Honma S, Yoshimura K, Honma KI, Nomura M (2000) cDNA cloning of a novel bHLH-PAS transcription factor superfamily gene, BMAL2: its mRNA expression, subcellular distribution, and chromosomal localization. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 493-502.
21. Kawano H, Horie M, Honma S, Kawamura K, Takeuchi K, Kimura S (2003) Aberrant trajectory of ascending dopaminergic pathway in mice lacking Nkx2.1. *Exp Neurol* 182: 103-112.
22. Keith B, Adelman DM, Simon MC (2001) Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6692-6697.
23. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ (1996) The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev* 10: 60-69.

24. Maemura K, de la Monte SM, Chin MT, Layne MD, Hsieh CM, Yet SF, Perrella MA, Lee ME (2000) CLIF, a novel cycle-like factor, regulates the circadian oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *J Biol Chem* 275: 36847-36851.
25. Marin O, Baker J, Puelles L, Rubenstein JL (2002) Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development* 129: 761-773.
26. Mastick GS, Easter SS, Jr. (1996) Initial organization of neurons and tracts in the embryonic mouse fore- and midbrain. *Dev Biol* 173: 79-94.
27. Michaud JL, DeRossi C, May NR, Holdener BC, Fan CM (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech Dev* 90: 253-261.
28. Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan C-M (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes & Development* 12: 3264-3275.
29. Moffett P, Pelletier J (2000) Different transcriptional properties of mSim-1 and mSim-2. *FEBS Lett* 466: 80-86.
30. Okano T, Sasaki M, Fukada Y (2001) Cloning of mouse BMAL2 and its daily expression profile in the suprachiasmatic nucleus: a remarkable acceleration of Bmal2 sequence divergence after Bmal gene duplication. *Neurosci Lett* 300: 111-114.
31. Pabst O, Herbrand H, Takuma N, Arnold HH (2000) NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesendodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos. *Dev Genes Evol* 210: 47-50.
32. Sharp PE, Blair HT, Cho J (2001) The anatomical and computational basis of the rat head-direction cell signal. *Trends Neurosci* 24: 289-294.

33. Takahata S, Sogawa K, Kobayashi A, Ema M, Mimura J, Ozaki N, Fujii-Kuriyama Y (1998) Transcriptionally active heterodimer formation of an Arnt-like PAS protein, Arnt3, with HIF-1a, HLF, and clock. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 789-794.
34. Valverde F, Garcia C, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA (2000) Development of the mammillothalamic tract in normal and Pax-6 mutant mice. *J Comp Neurol* 419: 485-504.
35. Van der Kooy D, Kuypers HGJM, Catsman-Berrevoets CE (1978) Single mammillary body cells with divergent axon collaterals. Demonstration by a simple, fluorescent retrograde double labeling technique in the rat. *Brain Research* 158: 189-196.
36. Vann SD, Aggleton JP (2003) Evidence of a spatial encoding deficit in rats with lesions of the mammillary bodies or mammillothalamic tract. *J Neurosci* 23: 3506-3514.
37. Vann SD, Aggleton JP (2004) The mammillary bodies: two memory systems in one? *Nat Rev Neurosci* 5: 35-44.
38. Wolting CD, McGlade CJ (1998) Cloning and chromosomal localization of a new member of the bHLH/PAS transcription factor family. *Mamm Genome* 9: 463-468.
39. Woods SL, Whitelaw ML. (2002) Differential activities of murine single minded 1 (SIM1) and SIM2 on a hypoxic response element. Cross-talk between basic helix-loop-helix/per-Arnt-Sim homology transcription factors. *J Biol Chem*, 277(12):10236-43.

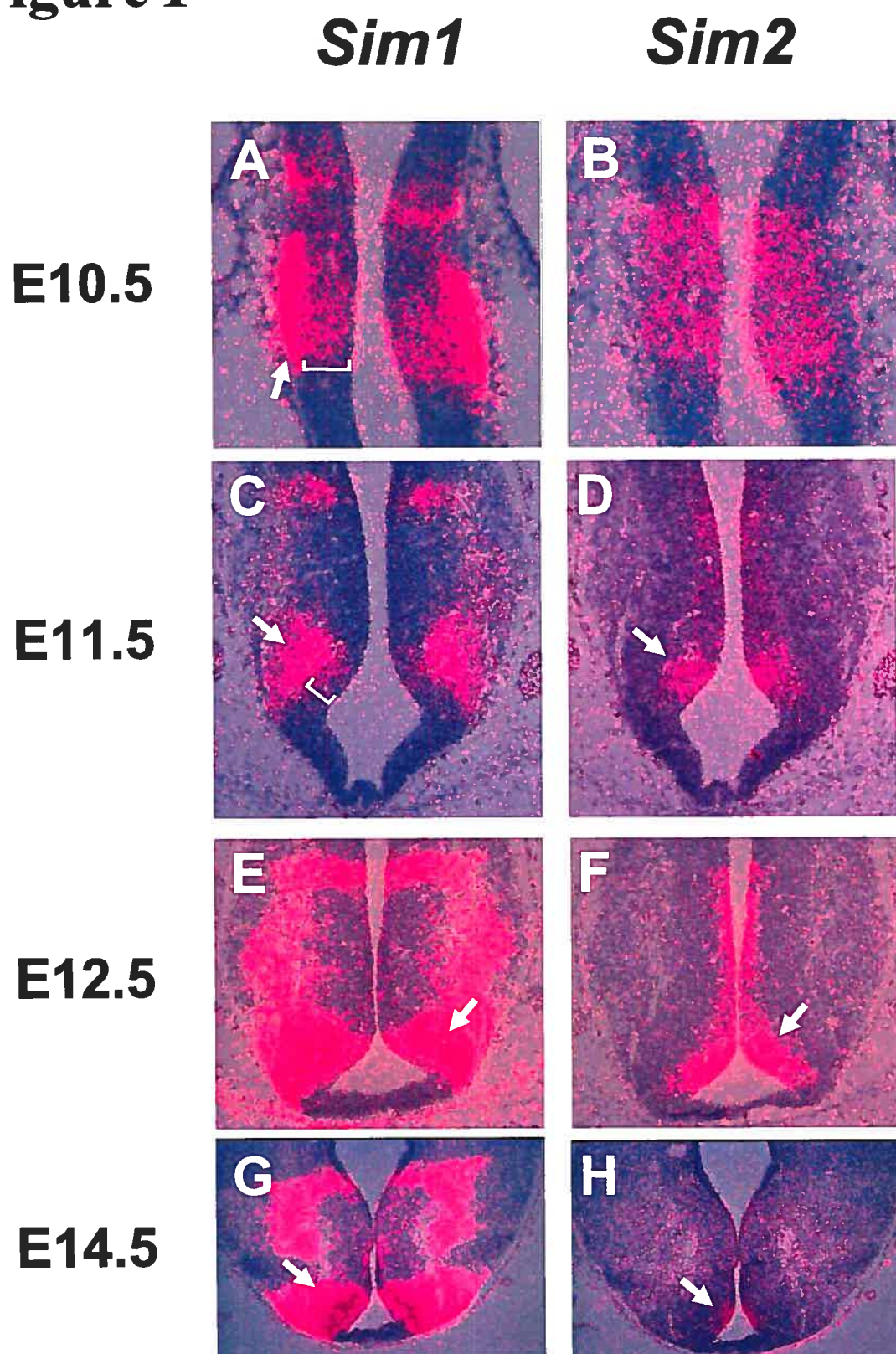
Figure 1

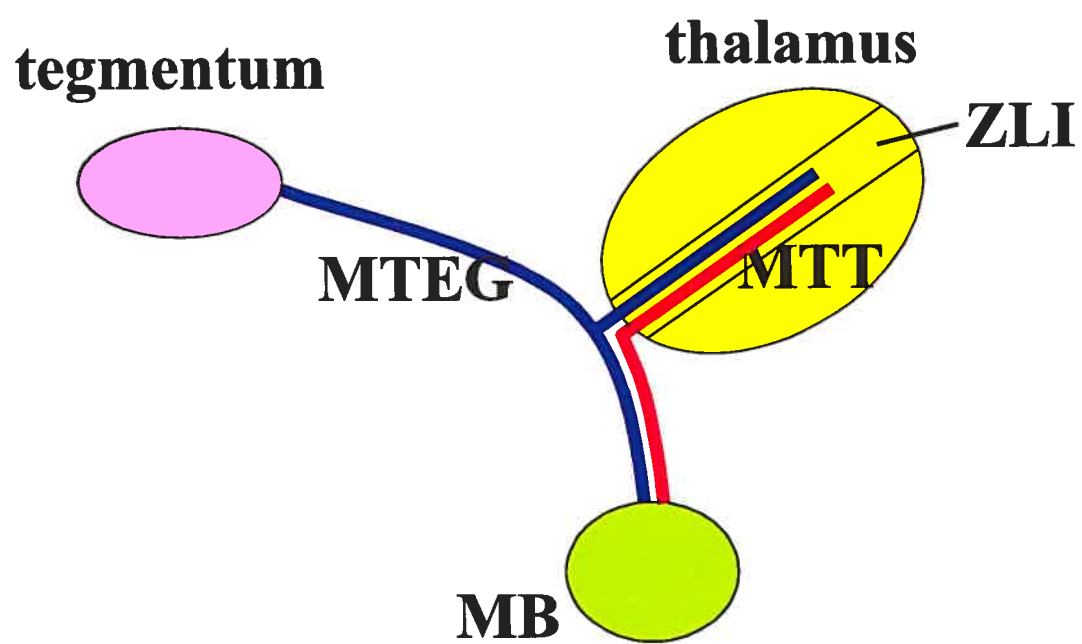
Figure 2

Figure 3

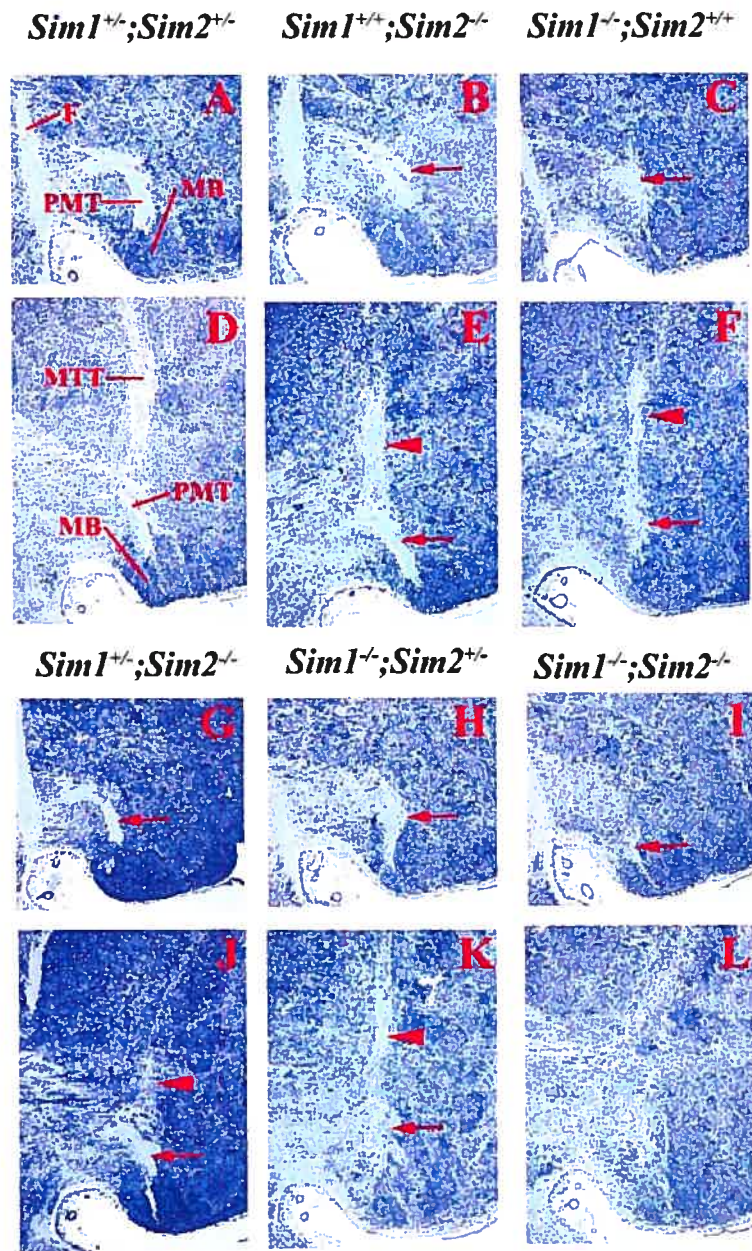


Figure 4

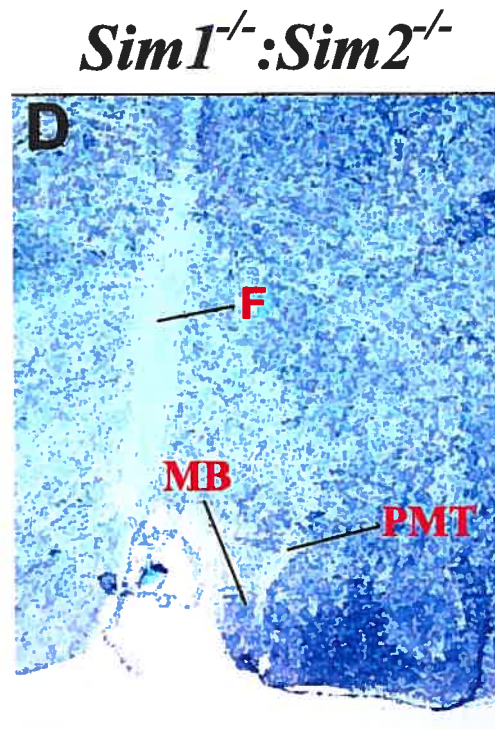
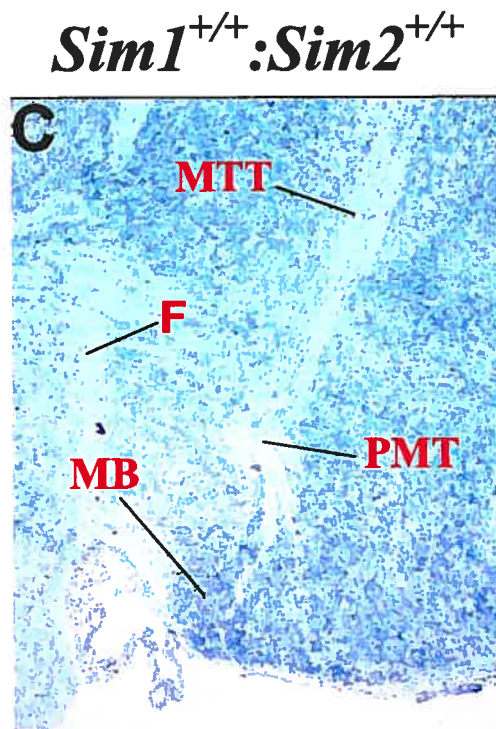
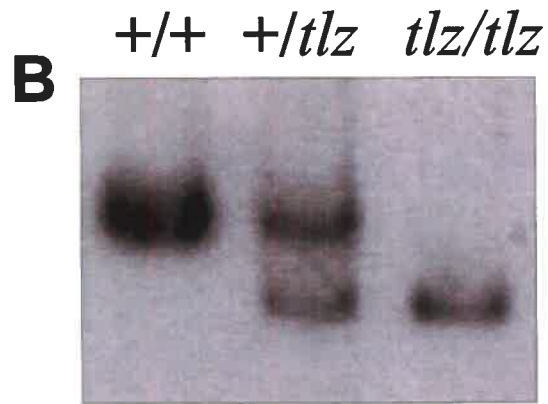
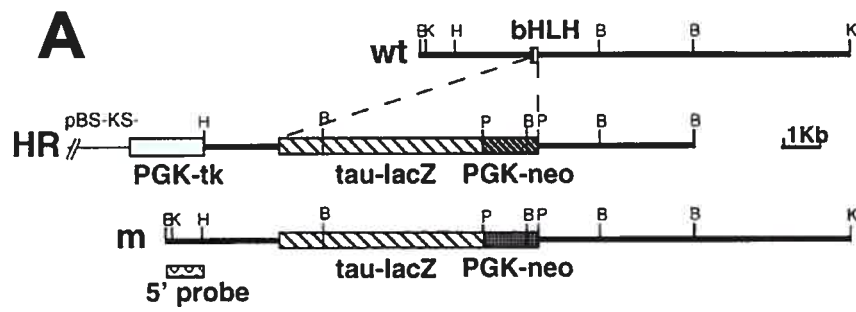


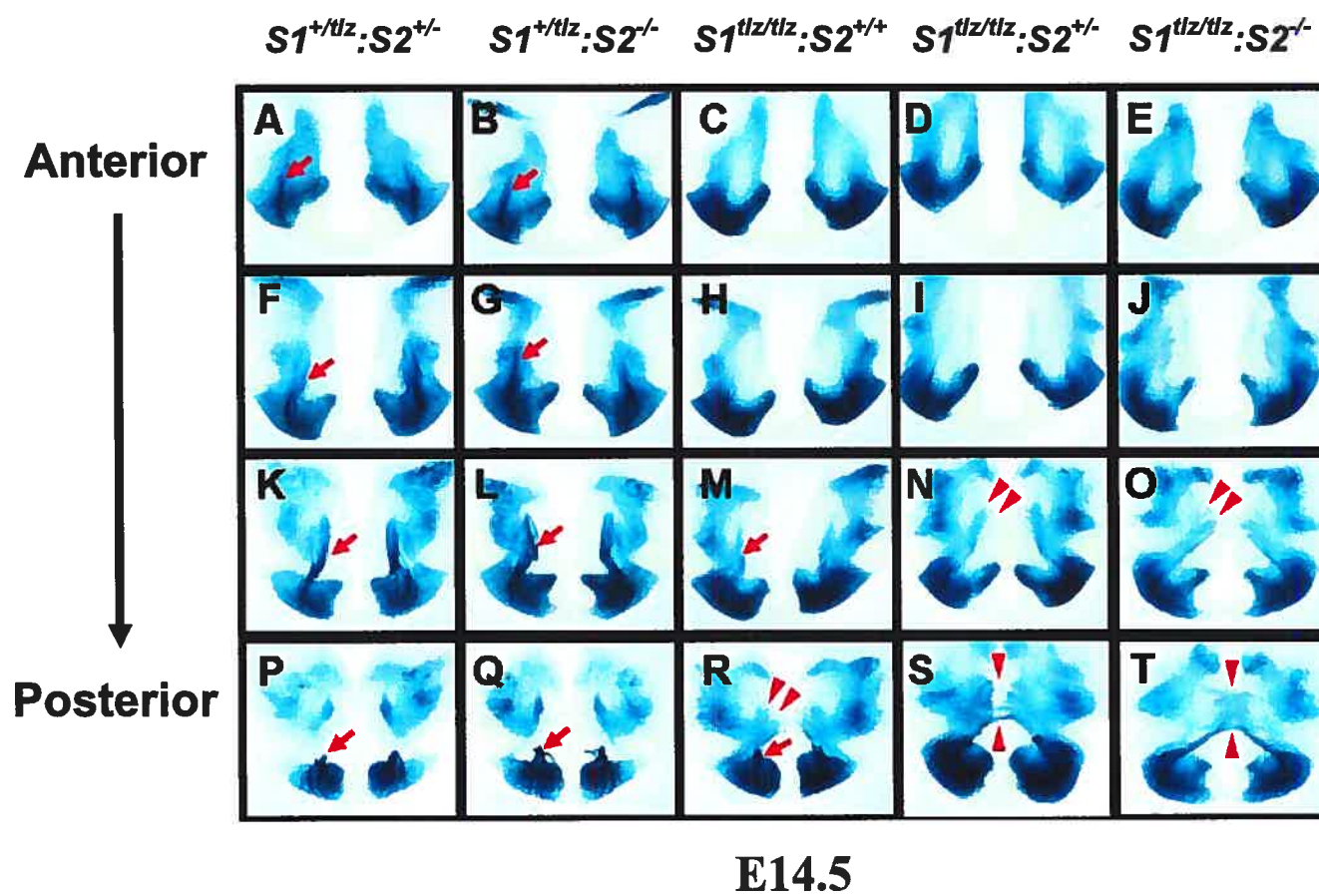
Figure 5

Figure 6

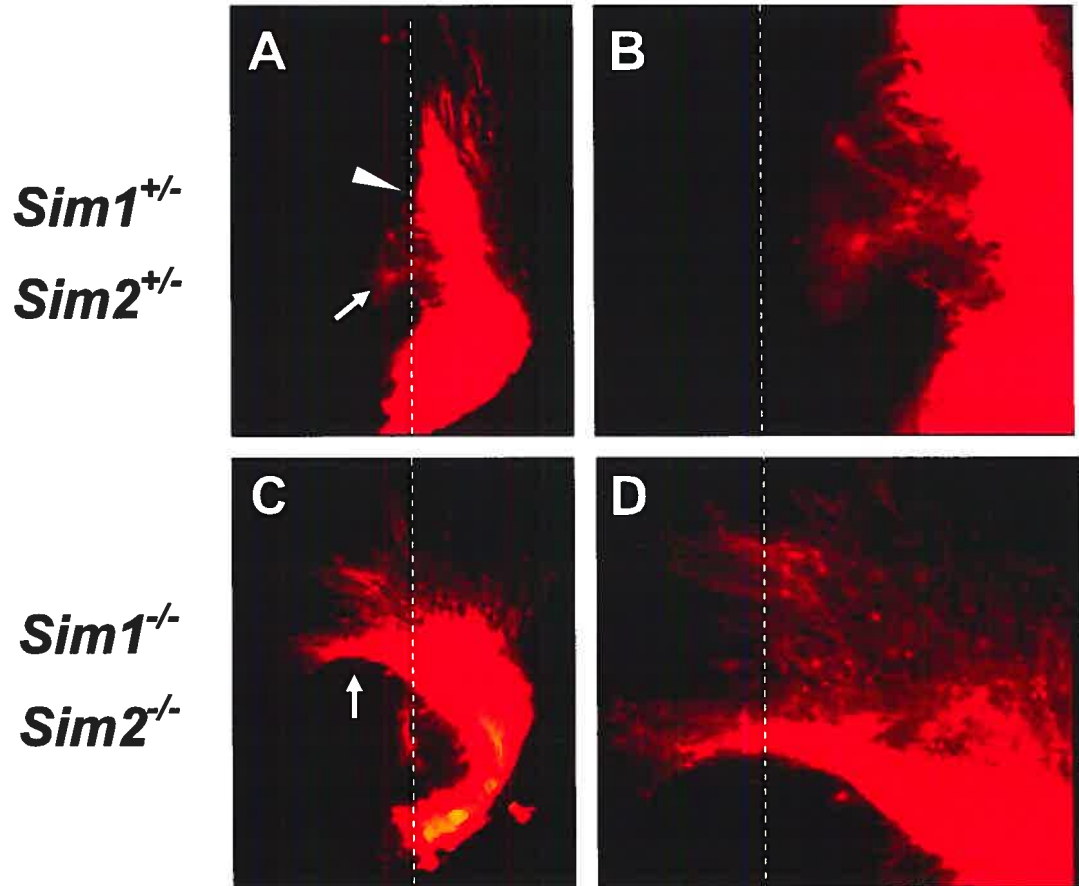


Figure 7

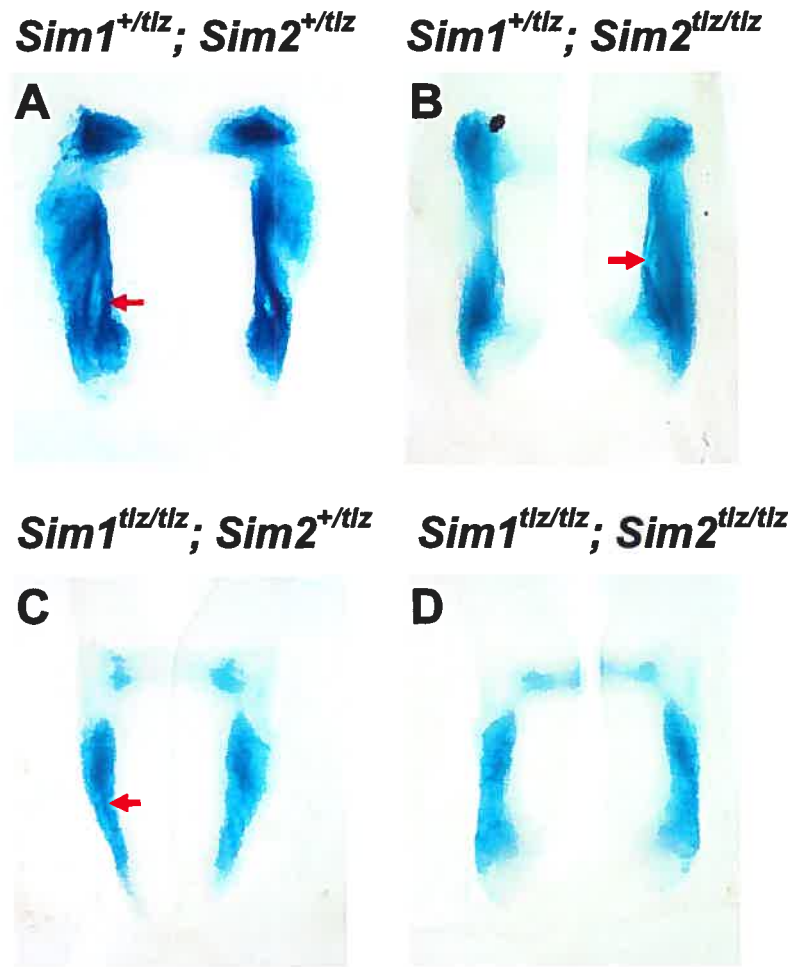


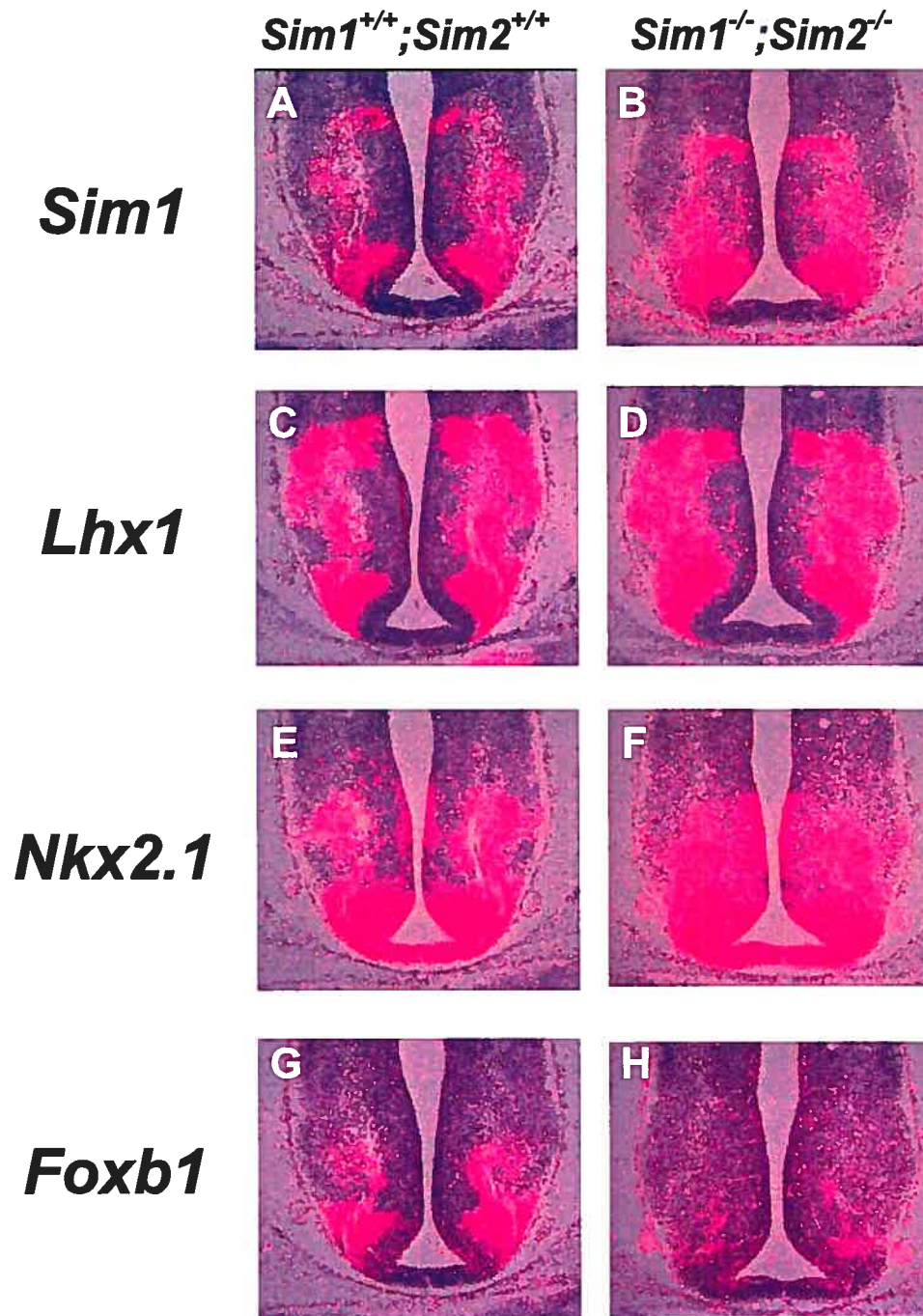
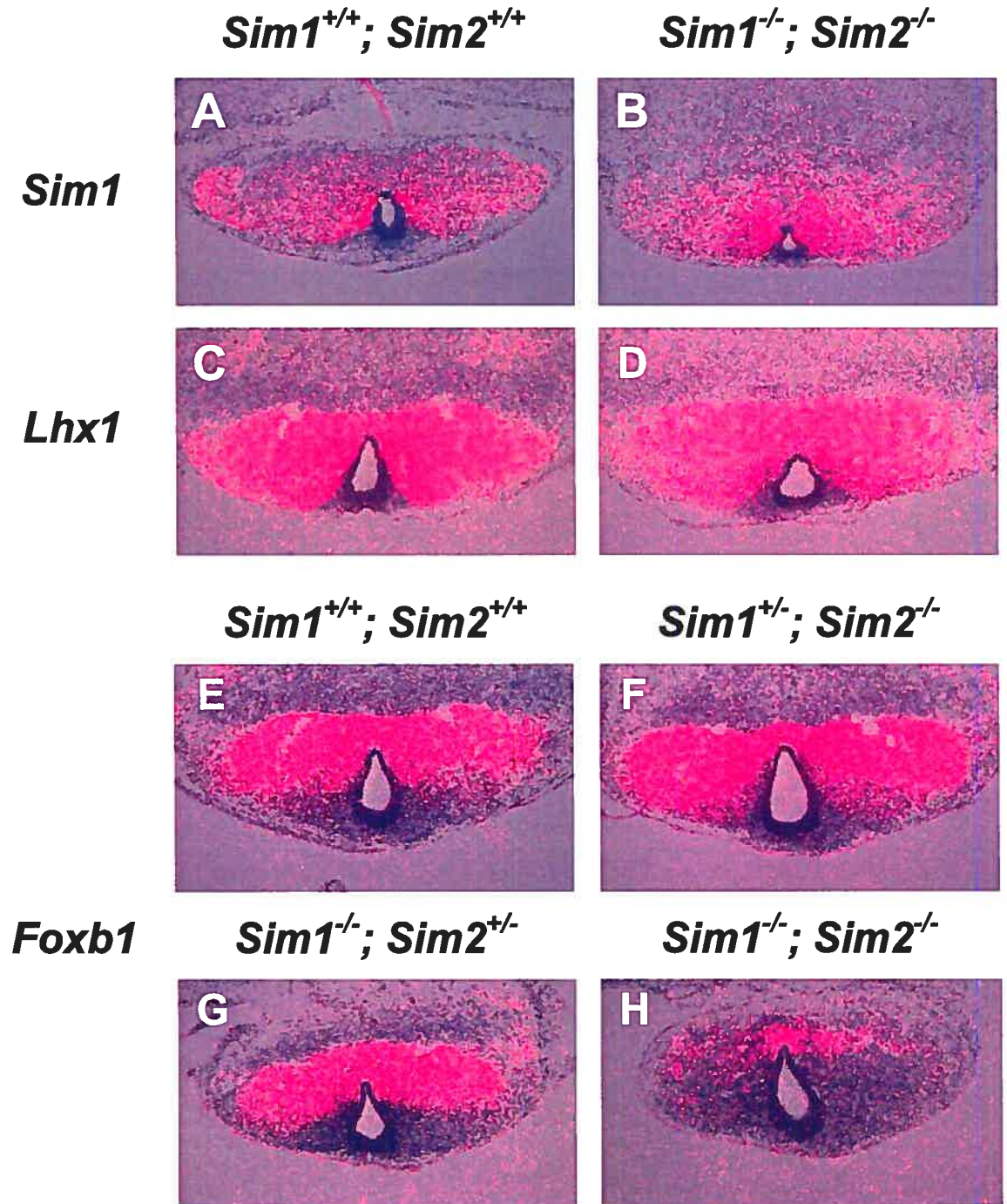
Figure 8

Figure 9



LEGENDS

Figure 1. Coexpression of *Sim1* and *Sim2* in the developing mammillary bodies. Adjacent coronal sections through the prospective MB of E10.5 (A,B), E11.5 (C,D), E12.5 (E,F) and E14.5 (G,H) wild-type embryos were hybridized either with *Sim1* (A,C,E,G) or *Sim2* (B,D,F,H). (A,B) At 10.5, *Sim1* is expressed in the lateral aspect of the neuroepithelium (arrow), which presumably corresponds to the mantle layer, but less strongly in the medial aspect (bracket), which corresponds to the ventricular layer. *Sim2* is mainly expressed in this medial domain. (C-F) At E11.5 and E12.5, *Sim1* is expressed strongly in the mantle layer, this domain corresponding to the prospective MB, but also weakly in the ventricular layer (bracket). *Sim2* is expressed in the ventricular layer and in the medial aspect of the mantle layer of the prospective MB. (G,H) At E14.5, *Sim1* shows the same expression pattern. *Sim2* expression has decreased in intensity and becomes restricted to the ventricular layer. The arrows indicate the prospective MB.

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

Figure 3. MTEG and MTT development affected by *Sim1/Sim2* gene dosage. E18.5 brains with various genotypes were sectioned sagittally and stained with hematoxylin. The

upper panels (A,B,C,G,H,I) represent medial sections containing the PMT whereas the lower panels correspond to lateral sections that include the MTT and the PMT. The MTEG is not readily detectable on sagittal sections because of its orientation. The PMT is indicated by arrows whereas the MTT by arrowheads. The PMT and MTT are well developed in *Sim1*^{+/-}:*Sim2*^{+/-} (A,D) and *Sim1*^{+/+}:*Sim2*^{-/-} (B,E) embryos whereas they were thinner in *Sim1*^{-/-}:*Sim2*^{+/+} (C,F), *Sim1*^{+/-}:*Sim2*^{-/-} (G,J) and *Sim1*^{-/-}:*Sim2*^{+/-} (H,K) embryos. The PMT and MTT were barely detectable in *Sim1*^{-/-}:*Sim2*^{-/-} embryos (I,L). In all cases, the MB appeared histologically present.

Figure 4. Creation of a *Sim1* allele expressing *Tau-lacZ*. (A) Schematic representation of the *Sim1* locus (wt), of the targeting vector (HR), and of the *Sim1* mutant allele (m). Homologous recombination replaces the initiation codon, the basic and the HLH domains by a *Tau-lacZ* fusion gene. The 5' external probe is indicated. Restriction enzymes: (B) *Bam*HI, (H) *Hind*III, (K) *Kpn*I. (B) Southern blot analysis of genomic DNA from *Sim1*^{+/+}, *Sim1*^{tlz/+} and *Sim1*^{tlz/tlz} mice. The 5' probe detects a wild-type (wt) 5.2-kb *Bam*HI fragment and a mutant (m) 4.5-kb *Bam*HI fragment. (C,D) Sagittal sections through the MB of *Sim1*^{+/+}:*Sim2*^{+/+} and *Sim1*^{-/-}:*Sim2*^{-/-} P0 mice which have been stained with hematoxylin. Loss of the *Sim1*^{tlz} allele interferes with the development of MB axons as did the *Sim1*⁻ allele.

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

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

Figure 7. *LacZ* staining of mammillary body axonal projections in E11.5 *Sim1/Sim2* mutant embryos. E11.5 brains with various genotypes, as indicated, were stained for β -galactosidase activity and sectioned coronally. Axonal bundles (arrows) are easily recognizable in *Sim1^{+/tlz};**Sim2^{+/tlz}* (A) and in *Sim1^{+/tlz};**Sim2^{tlz/tlz}* (B) embryos but decreased

in $Sim1^{tlz/tlz};Sim2^{+/tlz}$ (C). No bundle was detected in $Sim1^{+/tlz};Sim2^{+/tlz}$ embryos. Note that axons progress in a domain that is stained.

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

Figure 9. MB neurons survive until the end of gestation in *Sim1/Sim2* double mutants. Coronal sections through the MB of E18.5 with various dosage of *Sim1/Sim2*, as indicated, hybridized with *Sim1*, *Lhx1* and *Foxb1* probes. *Sim1* and *Lhx1* expression is maintained in MB of *Sim1/Sim2* double mutants. In contrast, *Foxb1* expression is dramatically reduced in *Sim1/Sim2* double mutants but not in embryos with at least one allele of *Sim1/Sim2*

Chapitre 3 : Discussion

1. Le noyau paraventriculaire versus le corps mammillaire

Sim1 agit tardivement dans la région du PVN. Son expression est détectée dans les cellules aussitôt que celles-ci quittent le cycle cellulaire. *Sim1* est donc requis pour le contrôle des étapes tardives du développement dans cette région. Dans la région du CM, il semble que le rôle de *Sim1* et *Sim2* soit aussi requis uniquement dans les phases tardives du développement. Les études histologiques et l'analyse de marqueurs démontrent que les cellules du CM sont générées en absence de *Sim1*. Une question est de savoir si ces cellules ont complété leur différenciation totalement ou en partie. Dans une prochaine expérience, il serait intéressant d'étudier un marqueur de différenciation terminale des cellules du CM tels que le glutamate et le récepteur à la dopamine de type 3. Si ces marqueurs étaient exprimés par les cellules du CM d'embryons mutants, nous pourrions avancer la conclusion que la perte de fonction de *Sim1* et *Sim2* affecte de façon spécifique le développement des axones. Autrement, il faudrait conclure qu'une perte de ces gènes perturbe de façon primaire la différenciation des ces neurones.

2. Le phénotype axonale chez les doubles mutants

Plusieurs observations chez les souris portant différents dosages des mutations pour *Sim1* et *Sim2* ont été faites. Les phénotypes les plus sévères sont cependant observés chez les souris doubles homozygotes pour les deux mutations (*Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-}) puisque chez ces souris, le MTT et le MTEG sont absents et les axones qui formaient ces deux faisceaux du côté ipsilatéral croisent la ligne médiane et progressent latéralement du côté contralatéral.

Sim1 et *Sim2* viennent donc s'ajouter à une liste grandissante de facteurs qui modulent le développement ou la progression des axones du CM.

Comparativement à *Pax6* et *Foxb1*, *Sim1* et *Sim2* n'affectent pas seulement le MTT mais tout le réseau axonale de la région du CM. De plus, le patron d'expression de *Foxb1* dans le CM chevauche celui de *Sim1* et *Sim2* et il est affecté chez les doubles mutants. Ceci laisse présager la possibilité que *Sim1* et *Sim2* agissent en amont de *Foxb1* dans une voie régissant le développement du CM. Pour ce qui est de *Pax6*, son expression n'est pas altérée ce qui suggère qu'il évolue probablement dans une voie adjacente et complémentaire à celle comprenant *Sim1* et *Sim2*. L'expression de *Pax6* n'est pas détectée au niveau du CM (Valverde et al. 2000) il n'est donc pas surprenant que *Sim1* et *Sim2* ne régule pas son expression.

Il a été proposé que *Pax6* n'agit pas sur l'émergence des axones du CM mais bien sur leur guidance au niveau des cibles puisqu'il est fortement exprimé dans une région sous-jacente à la zona limitans et non dans le CM (Valverde et al., 2000). *Sim1* et *Sim2* apportent ici un autre mode de fonctionnement de la modulation de la progression des axones. Chez le double mutant, le CM est intact. Les cellules sont toujours présentes et expriment le transcrit mutant des deux gènes. Par extrapolation, on peut supposer que les cibles des axones se développent normalement aussi puisque *Pax6*, un marqueur de la zona limitans est exprimé chez les doubles mutants. Le problème de guidance axonale est probablement situé entre le point de départ et le point d'arrivée des axones. Nous croyons acceptable de dire que *Sim1* et *Sim2* sont requis pour l'expression d'un récepteur situé sur le cône de

croissance des axones et que chez le double mutant, les axones ayant perdus ce récepteur sont désensibilisés à un signal de répulsion majoritairement effectif à la ligne médiane mais aussi tout au long de la progression des axones. Il est intéressant de mentionner qu'une fois qu'ils ont traversé la ligne médiane, les axones ne la recroisent pas et migrent de façon aléatoire. Il a été montré que l'homologue de *Sim1* et *Sim2* chez la Drosophile, *sim*, contrôle l'expression de *slit* qui est impliqué dans la guidance des axones par son interaction avec les récepteurs Robos, qui eux, sont sous le contrôle de *commissureless (Comm)*. *Comm* est un régulateur négatif des récepteurs Robos. La surexpression de *Comm* réduit considérablement le niveau d'expression des Robos. Il semble qu'il soit requis pour empêcher, dans certaine situation, l'accumulation des Robos. Le phénotype que nous observons chez les mutants *sim* est différent de celui observé chez les mutants *slit* et les mutants *robo*. Chez les mutants *slit*, les axones entrent dans la ligne médiane et n'en ressortent plus tandis que chez les mutants *robo*, les axones croisent et recroisent la ligne médiane sans restriction. Nous avons examiné l'expression des Slits et des Robos chez la souris et n'avons détecté aucune diminution de l'expression des ces facteurs. Cette observation nous laisse penser que *Sim1* et *Sim2* ne sont pas impliquée dans la régulation directe de l'expression des Slits et des Robos. Jusqu'ici aucun homologue de *commissureless* n'a été observé chez la souris. Il se peut que ce gène soit un facteur important dont la transcription est régit par *Sim1* ou *Sim2* ou les deux. Les quatre autres grandes familles de MGA comportent des récepteurs dont l'étude demande un grand intérêt. Jusqu'ici l'expression de trois récepteurs, plexine-A1 à A3, a été détectée au niveau du CM.

Cependant, leur patron d'expression n'est pas modifié chez les doubles mutants *Sim1* et *Sim2* (observations non-publiées). Les plexines sont des récepteurs pour une autre famille de MGA : les éphrines. Cette famille comporte de nombreux membres dont l'expression n'a pas encore été répertoriée au niveau du CM sauf pour l'Eph5A. Cette éphrine est exprimée au niveau du CM mais son expression ne semble pas affectée chez nos mutants (observations non-publiées).

De plus, la grande famille des sémaphorines comporte plusieurs récepteurs ayant un rôle dans le phénomène de la guidance des axones. Il semble pour l'instant qu'aucun de ses membres ne soit exprimé dans la région du CM. Cependant, l'étude plus approfondie de cette famille pourrait révéler des acteurs importants dans la guidance des axones du CM.

Une approche privilégiée dans le laboratoire pour répondre à la question à savoir où se situe le problème de guidance axonale réside dans la culture d'explant du CM. En cultivant des explants du CM d'embryons mutantes pour *Sim1* et *Sim2*, en comparaison avec des explants de CM d'embryons de type sauvage, nous allons être en mesure de déterminer si les axones sont capables d'émerger des deux types d'explants ou si l'émergence ne se produit que dans les CMs de type sauvage. Si les axones émergent uniquement des CMs sauvages, cela suggérera qu'un défaut est présent au niveau même des cellules des CMs mutants et que ces défauts sont probablement causés par une mauvaise différenciation des cellules des CMs. Dans le cas où les axones émergent des deux populations, des études comparatives devront être faites pour vérifier s'il y a perte de réponse des axones face à une MGA qui sera mise en contact avec les explants de souris

mutantes et sauvages. Si une différence de réponse est observée, cela pourrait signifier qu'en absence de *Sim1* et/ou *Sim2*, les axones sont désensibilisés à une MGA et que le phénotype observé est probablement dû à une mauvaise expression d'un récepteur de cette MGA au niveau du cône de croissance. Par contre, si aucune différence n'est répertoriée, il faudra vérifier les régions dans lesquelles les axones progressent puisque le défaut de guidance pourrait être probablement dû à la mauvaise expression d'un facteur dans le milieu environnant sous le contrôle de *Sim1/Sim2*.

Il se peut aussi que le problème soit au niveau de la transduction du signal après la liaison d'une MGA avec son récepteur. On peut imaginer une certaine rigidité des cônes de croissance qui ne peuvent plus progresser de manière normale dû à un déséquilibre entre la polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actines. Il semble que les GTPases soient des joueurs de plus en plus importants dans la modulation du signal des MGA (Kim et al. 2003; Guan & Rao, 2003; Menager & Kaibuchi, 2003). Cette observation augmente grandement le nombre de molécules cibles qui pourraient être régulées par *Sim1* et *Sim2*.

3. Activités transcriptionnelles de *Sim1/Sim2*

Dans le contexte de systèmes de transfection cellulaire, *Sim1* et *Sim2* ont des activités transcriptionnelles différentes : *SIM1:ARNT2* agit comme transactivateur alors que *SIM2:ARNT2* réprime la transcription (Moffet & Pelletier, 1999; Wood & Whitelaw, 2002). Notre analyse de mutants montre qu'au cours du développement du CM, *Sim1* et *Sim2* ont un rôle similaire. D'autres données *in vivo* indiquent aussi que ces gènes peuvent

avoir les mêmes fonctions (Goshu et al. 2004). Dans le cadre d'une collaboration, nous avons montré que *Sim1* et *Sim2* peuvent fonctionner de façon redondante au cours du développement du PVN. Ces différences entre les observations *in vitro* et *in vivo* pourraient être expliquées par l'utilisation de partenaires de dimérisation différents dans les deux contextes. En effet, *Arnt2* n'est pas requis pour le développement des axones du CM alors que *Arnt* est très faiblement exprimé dans le CM. Or, ces facteurs étaient les partenaires de *Sim1/Sim2* dans le contexte des études de transfection. Il ne faut pas oublier aussi les autres partenaires d'interaction possible comme *BMAL* et *BMAL1*. Eux aussi pourrait avoir un rôle à jouer dans les différences observées.

Sim1 a un rôle prépondérant en comparaison à *Sim2* pour le développement des axones du CM. Les structures primaires de *Sim1* et *Sim2* présentent un haut degré d'identité (90%) dans la région N-terminale (bHLH, PAS), mais très faible dans le région C-terminale (Fan et al. 1996). La différence au niveau de leur séquence C-terminale pourrait expliquer le rôle prédominant de l'un sur l'autre. Alternativement, il faudrait évoquer des différences dans la régulation de leur expression.

4. Autres fonctions de *Sim1* et *Sim2*.

Mise à part la guidance axonale, *Sim1* et *Sim2* pourraient avoir d'autres rôles au niveau du CM. En 2002, Brown et al. ont déterminé que certaines cellules responsables de la direction de la tête se situaient au niveau du CM (Brown et al. 2002). Le noyau mammillaire latéral contient des cellules qui sont requises pour l'orientation de l'animal

dans le plan horizontal. En présence de lésions de cette région, ces souris perdent la direction de leur tête et tourne en rond. Une hypothèse serait que les lésions peuvent venir imiter la même situation observée en absence de *Sim1* et *Sim2* au niveau du CM. Possiblement, les cellules de direction de la tête, en absence de *Sim1* et *Sim2*, ne sont pas capables de se différencier et d'effectuer leur action. Des études sont en cours au laboratoire pour déterminer le rôle de *Sim1* au niveau du cerveau mature. Cependant cette tâche sera ardue car les souris mutantes pour *Sim1* et *Sim2* meurent rapidement après la naissance, nous empêchant d'évaluer le rôle de *Sim1/Sim2* dans le CM mature. Les prochaines expériences vont être centralisées principalement sur *Sim1* car il est exprimé dans le cerveau adulte et que jusqu'ici aucune expression de *Sim2* n'a été répertoriée dans le cerveau mature. Il sera intéressant de voir si lorsque *Sim1* est muté de façon conditionnelle dans le cerveau mature, il y a perte de signal et perte de fonction des cellules de direction de la tête.

La surexpression de *Sim2* pourrait contribuer à certains phénotypes retrouvés chez les patients atteints du syndrome de Down, en diminuant par exemple la production de Drebrin dans le cortex (Ooe et al. 2004). Raz et al. (1995) ont observé que le CM était plus petit chez les patients atteints du syndrome de Down que chez les contrôles. Une possibilité serait que la surexpression de *Sim2* affecte la cognition de ces patients en perturbant le développement du CM. Par exemple, *Sim2* pourrait compétitionner avec *Sim1* pour la liaison à un partenaire de dimérisation et ainsi interférer avec la fonction de ce dernier.

Cette hypothèse pourrait être explorée par transgénisme en mettant à profit les modèles de souris déjà élaborés.

Tous ces fonctions et rôles possible de *Sim1* et *Sim2* font en sorte que ces facteurs méritent tout l'attention constamment grandissante qui leur est consacrée depuis un certain temps. Au cours du développement, le phénotype tellement sévère des souris homozygotes pour la mutation du gène *Sim1* ou *Sim2* ne permet pas aux souris de survivre. L'étude post-natale du rôle de ces facteurs est donc très ardue. Des outils sont présentement en développement dans le laboratoire pour rendre ces études possibles. L'étude en entier du rôle de ces deux facteurs devra donc attendre que cette étape critique soit franchie.

Bibliographie

- Acampora D, Postiglione MP, Avantsaggiato V, Di Bonito M, Vaccarino FM, Michaud J, Simeone A. (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev*, 13(21):2787-800.
- Aggleton JP, Hunt PR, Nagle S, Neave N. (1996) The effects of selective lesions within the anterior thalamic nuclei on spatial memory in the rat. *Behav Brain Res*, 81(1-2):189-98.
- Aggleton JP, Hunt PR, Shaw C. (1990) The effects of mammillary body and combined amygdala-fornix lesions on tests of delayed non-matching-to-sample in the rat. *Behav Brain Res*, 40(2):145-57.
- Aggleton JP, Neave N, Nagle S, Hunt PR. (1995) A comparison of the effects of anterior thalamic, mammillary body and fornix lesions on reinforced spatial alternation. *Behav Brain Res*, 68(1):91-101.
- Alvarez-Bolado G, Zhou X, Voss AK, Thomas T, Gruss P. (2000) Winged helix transcription factor Foxb1 is essential for access of mammillothalamic axons to the thalamus. *Development*, 127(5):1029-38.
- Ban T, Zyo K. (1963) Experimental studies on the mammillary peduncle and mammillotegmental tracts in the rabbit. *Med J Osaka Univ*.13:241-70.
- Becker L, Mito T, Takashima S, Onodera K. (1991) Growth and development of the brain in Down syndrome. *Prog Clin Biol Res*, 373:133-52.
- Becker LE, Armstrong DL, Chan F. (1986) Dendritic atrophy in children with Down's syndrome. *Ann Neurol*, 20(4):520-6.
- Blair H, Cho J, Sharp P.E. (1998) Role of the lateral mammillary nucleus in the rat head-direction circuit: a combined single unit recording and lesion study. *Neuron*, 21: 1387-1397.
- Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. (1999) Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell*. 96(6):795-806.
- Brown JE, Yates BJ, Taube JS. (2002) Does the vestibular system contribute to head direction cell activity in the rat? *Physiol Behav*. 77(4-5):743-8.
- Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M. (2003) The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell*. 113(1):11-23.
- Chrast R, Scott HS, Madani R, Huber L, Wolfer DP, Prinz M, Aguzzi A, Lipp HP, Antonarakis SE. (2000) Mice trisomic for a bacterial artificial chromosome with the single-minded 2 gene (Sim2) show phenotypes similar to some of those present in the partial trisomy 16 mouse models of Down syndrome. *Hum Mol Genet*. 9(12):1853-64.
- Crews ST, Thomas JB, Goodman CS. (1988) The Drosophila single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the per gene product. *Cell*. 52(1):143-51.
- Crews ST. (1998) Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes Dev*. 12(5):607-20.

- Dahmane N, Charron G, Lopes C, Yaspo ML, Maunoury C, Decorte L, Sinet PM, Bloch B, Delabar JM. (1995) Down syndrome-critical region contains a gene homologous to *Drosophila sim* expressed during rat and human central nervous system development. *Proc Natl Acad Sci* . 92(20):9191-5.
- Davenport, RW., Dou P., Rehder V., Kater SB. (1993) A sensory role for neuronal growth cone filopodia. *Nature*, 361(6414): 721-4.
- de Castro, F., Hu L., Drabkin, H., Sotelo, C., Chedotal. A. (1999) Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *J. Neurosci*. 19(11): 4428-36.
- de la Torre JR, Hopker VH, Ming GL, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Hemmati-Brivanlou A, Holt CE. (1997) Turning of retinal growth cones in a netrin-1 gradient mediated by the netrin receptor DCC. *Neuron*, 19(6):1211-24.
- Deyoung MP, Scheurle D, Damania H, Zylberberg C, Narayanan R. (2002) Down's syndrome-associated single minded gene as a novel tumor marker. *Anticancer Res*. (6A):3149-57.
- Dickson BJ, Keleman K. (2002) Netrins. *Curr Biol*. 12(5):R154-5.
- Dolwick KM, Schmidt JV, Carver LA, Swanson HI, Bradfield CA. (1993a) Cloning and expression of a human Ah receptor cDNA. *Mol Pharmacol*. (5):911-7.
- Dolwick KM, Swanson HI, Bradfield CA. (1993b) In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci* 90(18):8566-70.
- Easter SS Jr, Ross LS, Frankfurter A. (1993) Initial tract formation in the mouse brain. *J Neurosci*. 13(1):285-99.
- Ema M, Ikegami S, Hosoya T, Mimura J, Ohtani H, Nakao K, Inokuchi K, Katsuki M, Fujii-Kuriyama Y. (1999) Mild impairment of learning and memory in mice overexpressing the mSim2 gene located on chromosome 16: an animal model of Down's syndrome. *Hum Mol Genet*. 8(8):1409-15.
- Ema M, Morita M, Ikawa S, Tanaka M, Matsuda Y, Gotoh O, Saijoh Y, Fujii H, Hamada H, Kikuchi Y, Fujii-Kuriyama Y. (1996) Two new members of the murine Sim gene family are transcriptional repressors and show different expression patterns during mouse embryogenesis. *Mol Cell Biol*. (10):5865-75.
- Fan CM, Kuwana E, Bulfone A, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA, Crews S, Martinez S, Puelles L, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M. (1996) Expression patterns of two murine homologs of *Drosophila* single-minded suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Mol Cell Neurosci*. 7(1):1-16.
- Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA. (1997) Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (*Dcc*) gene. *Nature*, 386(6627):796-804.
- Gekakis N, Saez L, Delahaye-Brown AM, Myers MP, Sehgal A, Young MW, Weitz CJ. (1995) Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science*. 270(5237):811-5.
- Gilhuis HJ, van Ravenswaaij CM, Hamel BJ, Gabreels FJ. (2000) Interstitial 6q deletion with a Prader-Willi-like phenotype: a new case and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol*. 4(1):39-43.

- Goshu E, Jin H, Fasnacht R, Sepenski M, Michaud JL, Fan CM. (2002) Sim2 mutants have developmental defects not overlapping with those of Sim1 mutants. *Mol Cell Biol.* (12):4147-57.
- Goshu E, Jin H, Lovejoy J, Marion JF, Michaud JL, Fan CM. (2004) Sim2 Contributes to Neuroendocrine Hormone Gene Expression in the Anterior Hypothalamus. *Mol Endocrinol.* Feb 26 [Epub ahead of print]
- Grunwald, IC., Klein, R. (2002) Axon guidance: receptor complexes and signaling mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12(3): 250-9.
- Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40:519-61.
- Guan KL, Rao Y. (2003) Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues. *Nat Rev Neurosci.* 4(12):941-56.
- Guthrie S, Pini A. (1995) Chemorepulsion of developing motor axons by the floor plate. *Neuron,* 14(6):1117-30.
- Guthrie S. (2001) Axon guidance: Robos make the rules. *Curr Biol.* 11(8).
- Hamelin M, Zhou Y, Su MW, Scott IM, Culotti JG. (1993) Expression of the UNC-5 guidance receptor in the touch neurons of *C. elegans* steers their axons dorsally. *Nature.* 364(6435):327-30.
- Hayakawa T, Zyo K. (1989) Retrograde double-labeling study of the mammillothalamic and the mammillotegmental projections in the rat. *J Comp Neurol.* 284(1):1-11.
- Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH. (1990) The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron.* (1):61-85.
- Henkemeyer M, Orioli D, Henderson JT, Saxton TM, Roder J, Pawson T, Klein R. (1996) Nuk controls pathfinding of commissural axons in the mammalian central nervous system. *Cell,* 86(1):35-46.
- Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H, Saijo Y, Gotoh O, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. (1996) cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol,* 16(4):1706-13.
- Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, Hankinson O. (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science,* 252(5008):954-8.
- Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, Gu YZ, Pray-Grant M, Perdew GH, Bradfield CA. (1997) Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem,* 272(13):8581-93.
- Hogenesch JB, Gu YZ, Moran SM, Shimomura K, Radcliffe LA, Takahashi JS, Bradfield CA. (2000) The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J Neurosci,* 20(13):RC83.
- Holder JL Jr, Butte NF, Zinn AR. (2000) Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet.* 9(1):101-8.

- Holmes GP, Negus K, Burridge L, Raman S, Algar E, Yamada T, Little MH. (1998) Distinct but overlapping expression patterns of two vertebrate slit homologs implies functional roles in CNS development and organogenesis. *Mech Dev*, 79(1-2):57-72.
- Hong K, Hinck L, Nishiyama M, Poo MM, Tessier-Lavigne M, Stein E. (1999) A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion. *Cell* 97(7):927-41.
- Hosoya T, Oda Y, Takahashi S, Morita M, Kawachi S, Ema M, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. (2001) Defective development of secretory neurons in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes Cells*, 6(4):361-74.
- Huber, AB., Kolodkin, AL., Ginty, DD., Cloutier JF. (2003) Signaling at the growth cone: ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 509-63.
- Imamura K, Shirao T, Mori K, Obata K. (1992) Changes of drebrin expression in the visual cortex of the cat during development. *Neurosci Res*, 13(1):33-41.
- Isbister, CM., O'Connor, TP. (2000) Mechanisms of growth cone guidance and motility in the developing grasshopper embryo. *J. Neurobol.* 44(2): 271-80.
- Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM. (1992) UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron*. (5):873-81.
- Itoh A, Miyabayashi T, Ohno M, Sakano S. (1998) Cloning and expressions of three mammalian homologues of *Drosophila* slit suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 62(2):175-86.
- Kaprielian Z, Imondi R, Runko E. (2000) Axon guidance at the midline of the developing CNS. *Anat Rec.* 261(5):176-97.
- Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS, Culotti JG, Tessier-Lavigne M. (1996) Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell*. 18;87(2):175-85.
- Keleman K, Dickson BJ. Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron*. 32(4):605-17.
- Kennedy TE, Serafini T, de la Torre JR, Tessier-Lavigne M. (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell*. 78(3):425-35.
- Kennedy TE. (2000) Cellular mechanisms of netrin function: long-range and short-range actions. *Biochem. Cell. Biol.* 78(5) 569-75.
- Kidd T, Bland KS, Goodman CS. (1999) Slit is the midline repellent for the robo receptor in *Drosophila*. *Cell*. 96(6):785-94.
- Kim MD, Kamiyama D, Kolodziej P, Hing H, Chiba A. (2003) Isolation of Rho GTPase effector pathways during axon development. *Dev Biol.* 262(2):282-93.
- Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ. (1996) The T/ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary. *Genes Dev*, 10(1):60-9.

- Kobayashi H, Koppel AM, Luo Y, Raper JA. (1997) A role for collapsin-1 in olfactory and cranial sensory axon guidance. *J Neurosci*. 17(21):8339-52.
- Lauderdale JD, Davis NM, Kuwada JY. (1997) Axon tracts correlate with netrin-1a expression in the zebrafish embryo. *Mol Cell Neurosci*, 9(4):293-313.
- Létourneau, PC. (1975) Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. *Dev. Biol.* 44(1): 92-101.
- Lewis, AK., Bridgman, PC. (1992) Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *J. Cell. Biol.* 119(5): 1219-43.
- Li HS, Chen JH, Wu W, Fagaly T, Zhou L, Yuan W, Dupuis S, Jiang ZH, Nash W, Gick C, Ornitz DM, Wu JY, Rao Y. (1999) Vertebrate slit, a secreted ligand for the transmembrane protein roundabout, is a repellent for olfactory bulb axons. *Cell*, 96(6):807-18.
- Menager C, Kaibuchi K. (2003) Rho proteins: their function in neurons. *Med Sci* 19(3):358-63.
- Meyerhardt JA, Caca K, Eckstrand BC, Hu G, Lengauer C, Banavali S, Look AT, Fearon ER. (1999) Netrin-1: interaction with deleted in colorectal cancer (DCC) and alterations in brain tumors and neuroblastomas. *Cell Growth Differ*, 10(1):35-42.
- Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Levy E, Mitchell GA, Himms-Hagen J, Fan CM. (2001) Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet*. 10(14):1465-73.
- Michaud JL, DeRossi C, May NR, Holdener BC, Fan CM. (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech Dev*. 90(2):253-61.
- Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM. (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev*.;12(20):3264-75.
- Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ. (1996) Genetic analysis of Netrin genes in Drosophila: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron*, 17(2):203-15.
- Moffett P, Pelletier J. (2000) Different transcriptional properties of mSim-1 and mSim-2. *FEBS Lett*, 466(1):80-6.
- Moffett P, Reece M, Pelletier J. (1997) The murine Sim-2 gene product inhibits transcription by active repression and functional interference. *Mol Cell Biol*, 17(9):4933-47.
- Muenke M, Bone LJ, Mitchell HF, Hart I, Walton K, Hall-Johnson K, Ippel EF, Dietz-Band J, Kvaloy K, Fan CM. (1995) Physical mapping of the holoprosencephaly critical region in 21q22.3, exclusion of SIM2 as a candidate gene for holoprosencephaly, and mapping of SIM2 to a region of chromosome 21 important for Down syndrome. *Am J Hum Genet* 57(5):1074-9.
- Nakai S, Kawano H, Yudate T, Nishi M, Kuno J, Nagata A, Jishage K, Hamada H, Fujii H, Kawamura K, 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):3109-21.

- Nambu JR, Lewis JO, Wharton KA Jr, Crews ST. The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67(6):1157-67.
- Ooe N, Saito K, Mikami N, Nakatuka I, Kaneko H. (2004) Identification of a novel basic helix-loop-helix-PAS factor, NXF, reveals a Sim2 competitive, positive regulatory role in dendritic-cytoskeleton modulator drebrin gene expression. *Mol Cell Biol*, 24(2):608-16.
- Placzek M, Tessier-Lavigne M, Jessell T, Dodd J. (1990) Orientation of commissural axons in vitro in response to a floor plate-derived chemoattractant. *Development*, 110(1):19-30.
- Probst MR, Fan CM, Tessier-Lavigne M, Hankinson O. (1997) Two murine homologs of the *Drosophila* single-minded protein that interact with the mouse aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein. *J Biol Chem*. 272(7):4451-7.
- Rajagopalan S, Nicolas E, Vivancos V, Berger J, Dickson BJ. (2000a) Crossing the midline: roles and regulation of Robo receptors. *Neuron*. 28(3):767-77.
- Rajagopalan S, Vivancos V, Nicolas E, Dickson BJ. (2000b) Selecting a longitudinal pathway: Robo receptors specify the lateral position of axons in the *Drosophila* CNS. *Cell*. 103(7):1033-45.
- Risold PY, Swanson LW. (1995) Evidence for a hypothalamothalamocortical circuit mediating pheromonal influences on eye and head movements. *Proc Natl Acad Sci* 92(9):3898-902.
- Rothberg JM, Jacobs JR, Goodman CS, Artavanis-Tsakonas S. (1990) slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev*. 2169-87.
- Schaefer, AW., Kabir, N., Forscher, P. (2002) Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J. Cell. Biol.* 158(1): 139-52.
- Schonemann MD, Ryan AK, McEvelly RJ, O'Connell SM, Arias CA, Kalla KA, Li P, Sawchenko PE, Rosenfeld MG. (1995) Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2. *Genes Dev*, 9(24):3122-35.
- Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS. (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10(3):409-26.
- Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. (1996) Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell*. 87(6):1001-14.
- Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*. 78(3):409-24.
- Shamblott MJ, Bugg EM, Lawler AM, Gearhart JD. (2002) Craniofacial abnormalities resulting from targeted disruption of the murine Sim2 gene. *Dev Dyn*. 224(4):373-80.
- Shen CL. (1983) Efferent projections from the lateral hypothalamus in the guinea pig: an autoradiographic study. *Brain Res Bull*. 11(3):335-47.

- Simpson JH, Bland KS, Fetter RD, Goodman CS. (2000a) Short-range and long-range guidance by Slit and its Robo receptors: a combinatorial code of Robo receptors controls lateral position. *Cell*. 103(7):1019-32.
- Simpson JH, Kidd T, Bland KS, Goodman CS. (2000b) Short-range and long-range guidance by slit and its Robo receptors. Robo and Robo2 play distinct roles in midline guidance. *Neuron*. 28(3):753-66.
- Skarnes WC, Moss JE, Hurtley SM, Beddington RS. (1995) Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development. *Proc Natl Acad Sci*. 92(14):6592-6.
- Stein E, Tessier-Lavigne M. (2001) Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science*. 291(5510):1928-38.
- Sutherland RJ, Rodriguez AJ. (1989) The role of the fornix/fimbria and some related subcortical structures in place learning and memory. *Behav Brain Res*, 32(3):265-77.
- Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA. (1995) DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem*. 270(44):26292-302.
- Swanson LW, Sawchenko PE. (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci*. 6:269-324.
- Tanaka Y, Miyazawa Y, Akaoka F, Yamada T. (1997) Amnesia following damage to the mammillary bodies. *Neurology*. 48(1):160-5.
- Tanaka, E., Sabry, J. (1995) Making the connection: cytoskeletal rearrangements during growth cone guidance. *Cell*, 83(2): 171-6.
- Taube JS. (1998) Head direction cells and the neurophysiological basis for a sense of direction. *Prog. Neurobiol*, 55: 225-256.
- Tear G. (2001) A new code for axons. *Nature*. 409(6819):472-3.
- Tessier-Lavigne M, Placzek M, Lumsden AG, Dodd J, Jessell TM. (1988) Chemotropic guidance of developing axons in the mammalian central nervous system. *Nature*, 336(6201):775-8.
- Tessier-Lavigne, M., Goodman, CS. (1996) The molecular biology of axon guidance. *Science*, 274(5290): 1123-33.
- Thomas JB, Crews ST, Goodman CS. (1988) Molecular genetics of the single-minded locus: a gene involved in the development of the Drosophila nervous system. *Cell*. 52(1):133-41.
- Valverde F, Garcia C, Lopez-Mascaraque L, De Carlos JA. (2000) Development of the mammillothalamic tract in normal and Pax-6 mutant mice. *J Comp Neurol*. 419(4):485-504.
- van Deurs B, von Bulow F, Vilhardt F, Holm PK, Sandvig K. (1996) Destabilization of plasma membrane structure by prevention of actin polymerization. Microtubule-dependent tubulation of the plasma membrane. *J Cell Sci*. 109 (7):1655-65.
- van Groen T, Kadish I, Wyss JM. (2002) The role of the laterodorsal nucleus of the thalamus in spatial learning and memory in the rat. *Behav Brain Res*, 136(2):329-37.

- Vann SD, Aggleton JP. (2003) Evidence of a spatial encoding deficit in rats with lesions of the mammillary bodies or mammillothalamic tract. *J Neurosci*. 23(8):3506-14.
- Vann SD, Aggleton JP. (2004) The mammillary bodies: two memory systems in one? *Nat Rev Neurosci*, 5(1):35-44.
- Varela-Echavarria A, Guthrie S. (1997) Molecules making waves in axon guidance. *Genes Dev*. 11(5):545-57.
- Varela-Echavarria A, Tucker A, Puschel AW, Guthrie S. (1997) Motor axon subpopulations respond differentially to the chemorepellents netrin-1 and semaphorin D. *Neuron*. 18(2):193-207.
- Vialard F, Toyama K, Vernoux S, Carlson EJ, Epstein CJ, Sinet PM, Rahmani Z. (2000) Overexpression of mSim2 gene in the zona limitans of the diencephalon of segmental trisomy 16 Ts1Cje fetuses, a mouse model for trisomy 21: a novel whole-mount based RNA hybridization study. *Brain Res Dev Brain Res*. 121(1):73-8.
- Wang W, Lufkin T. (2000) The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol*, 227(2):432-49.
- Weitzdoerfer R, Dierssen M, Fountoulakis M, Lubec G. (2001) Fetal life in Down syndrome starts with normal neuronal density but impaired dendritic spines and synaptosomal structure. *J Neural Transm Suppl*, (61):59-70.
- Wilkinson DG. (2001) Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci*. 2(3):155-64.
- Woods SL, Whitelaw ML. (2002) Differential activities of murine single minded 1 (SIM1) and SIM2 on a hypoxic response element. Cross-talk between basic helix-loop-helix/per-Arnt-Sim homology transcription factors. *J Biol Chem*, 277(12):10236-43.
- Yu TW, Bargmann CI. (2001) Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci*. 4 Suppl:1169-76.
- Zelzer E, Shilo BZ. (2000) Interaction between the bHLH-PAS protein Tracheless and the POU-domain protein Drifter, specifies tracheal cell fates. *Mech Dev*, 91(1-2):163-73.