



**HAL**  
open science

# ETUDE FONCTIONNELLE DU GENE GATA2 AU COURS DE LA NEUROGENESE DANS LA MOELLE EPINIÈRE VENTRALE EMBRYONNAIRE

Cédric Francius

► **To cite this version:**

Cédric Francius. ETUDE FONCTIONNELLE DU GENE GATA2 AU COURS DE LA NEUROGENESE DANS LA MOELLE EPINIÈRE VENTRALE EMBRYONNAIRE. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : . tel-00184253

**HAL Id: tel-00184253**

**<https://theses.hal.science/tel-00184253>**

Submitted on 30 Oct 2007

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE - PARIS VI**

École Doctorale : **Logique du Vivant**  
Spécialité : **Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement**

Présentée par **Cédric FRANCIUS**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Titre :

**ÉTUDE FONCTIONNELLE DU GENE GATA2 AU COURS DE LA  
NEUROGENESE DANS LA MOELLE EPINIERE VENTRALE  
EMBRYONNAIRE.**

Soutenue publiquement le 27 Septembre 2007, devant le jury composé de :

<b>M. Thierry DARRIBERE</b> , Université Pierre & Marie Curie, Paris VI	Président du Jury
<b>Mme Muriel PERRON</b> , Université Paris Sud, CNRS UMR 8080, Orsay	Rapporteur
<b>M. Jean François BRUNET</b> , CNRS UMR 8542, Paris	Rapporteur
<b>M. Carlos PARRAS</b> , INSERM U711, Paris	Examineur
<b>M. Michel TARPIN</b> , Université de Reims Champagne Ardennes, Reims	Examineur
<b>Mme Jeannette NARDELLI</b> , LGN CNRS UMR 7091, Paris	Directeur de Thèse



**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE - PARIS VI**

École Doctorale : **Logique du Vivant**  
Spécialité : **Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement**

Présentée par **Cédric FRANCIUS**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Titre :

**ÉTUDE FONCTIONNELLE DU GENE GATA2 AU COURS DE LA  
NEUROGENESE DANS LA MOELLE EPINIÈRE VENTRALE  
EMBRYONNAIRE.**

Soutenue publiquement le 27 Septembre 2007, devant le jury composé de :

<b>M. Thierry DARRIBERE</b> , Université Pierre & Marie Curie, Paris VI	Président du Jury
<b>Mme Muriel PERRON</b> , Université Paris Sud, CNRS UMR 8080, Orsay	Rapporteur
<b>M. Jean François BRUNET</b> , CNRS UMR 8542, Paris	Rapporteur
<b>M. Carlos PARRAS</b> , INSERM U711, Paris	Examineur
<b>M. Michel TARPIN</b> , Université de Reims Champagne Ardennes, Reims	Examineur
<b>Mme Jeannette NARDELLI</b> , LGN CNRS UMR 7091, Paris	Directeur de Thèse



*À ma mère et mon père pour leur soutien indéfectible.*

*À ma sœur Nathalie.*

*À mes frères, Grégory, Rony et Mickaël.*

*À ma tante Marise.*

*À ma famille,*

*À tous mes amis et tous ceux que j'aime...*

*Un grand merci*



## REMERCIEMENTS

*Mes travaux ont été effectués au sein du LGN CNRS UMR 7091 à Paris, spécialisé dans l'étude des mécanismes génétiques et moléculaires, à l'origine des maladies affectant le système nerveux. Je tiens avant tout à remercier très sincèrement Monsieur le Docteur Jacques MALLET, Directeur du laboratoire, de m'avoir accueilli dans sa structure de recherches.*

*D'autre part, je tiens à témoigner toute ma gratitude à l'Association Française contre les Myopathies (AFM) pour avoir soutenu financièrement ma thèse, et également à Madame le Docteur Gillian BUTLER-BROWNE, qui m'a accueilli dans son laboratoire durant les deux premières années de ma thèse.*

*Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à Madame Jeannette NARDELLI, pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour m'avoir formé au métier de chercheur et pour m'avoir guidé avec une grande disponibilité et étroitement encadré durant ces quatre années. J'adresse ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Martin CATALA, Praticien Hospitalier et Professeur à la Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière de l'Université Pierre & Marie Curie Paris VI, à Monsieur Philippe RAVASSARD, Chargé de Recherche au LGN CNRS UMR 7091 et à Monsieur le Professeur Herbert KOENIG, pour leurs conseils avisés et pour les nombreuses discussions scientifiques critiques et constructives. Je les remercie tous de leur confiance ainsi que pour leurs encouragements.*

*Je suis également très sensible à l'honneur que me font les membres du Jury en acceptant de juger ma thèse. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Monsieur Thierry DARRIBERE, Professeur à l'Université Pierre & Marie Curie Paris VI, Monsieur Jean-François BRUNET, Directeur de Recherche à l'UMR CNRS 8542 (Paris), et Madame Muriel PERRON, Directeur de Recherche à l'UMR CNRS 8080 de l'Université Paris-Sud (Orsay), d'avoir accepté d'intervenir en tant que rapporteurs de ce travail. J'adresse toute ma reconnaissance à Monsieur Carlos PARRAS, Chargé de recherche à l'unité INSERM U711 (Paris), et Monsieur Michel TARPIN, Maître de conférence à la*



*Faculté des Sciences exactes et naturelles de l'Université de Reims Champagne - Ardennes (Reims), qui se sont joints à ce jury en tant qu'examineurs.*

*Cette étude est l'aboutissement d'un travail d'équipe. Aussi, je souhaite remercier tous les participants et notamment ceux qui m'ont encouragé et soutenu durant la réalisation de ce travail.*

*Un grand Merci à tous mes collègues et amis, en particulier à Monsieur Sébastien DUSSAUD, pour la production des lignées de souris transgéniques, à Monsieur Jack FORMENTIN pour la gestion des lignées de souris transgéniques, à Madame Jocelyne PLEAU-VARET, pour son aide et ses précieux conseils techniques. Mes remerciements à Mademoiselle Liliana OSORIO, Mademoiselle Olfa KHALFALLAH, Monsieur Mathieu DESCLAUX, Mademoiselle Claire SAUTY, Madame Isabelle BRUNET, Monsieur Nuno AFONSO, Madame Annie WOLFF pour leurs bons conseils et leurs encouragements.*

*Je remercie enfin l'ensemble du personnel du LGN, et en particulier, Caroline BIDON, Krzysztof POTEMPA, Yasmine HAZHOUS, Raphaël VAMPOUILLE, Emilie NEVEU, Elisa BAYARD, Mathilde NIANG, Cyrille LONCIN, Cécile FLIGNY, Francine COTE, Angéline SERRE, Julie SANTAMARIA, Marie José LECOMTE, Dorothée HENRIOT, Corinne PARDANNAUD et Lahouari AMAR, pour l'ambiance exceptionnelle qui règne au laboratoire ainsi que pour les moments sympathiques partagés à l'intérieur comme en dehors de l'Unité.*

## TABLE DES MATIERES

<b>Remerciements .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>XII</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>XX</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
<b>1. Généralités sur le système nerveux. ....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.LES NEURONES. ....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.LES CELLULES GLIALES.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Le développement embryonnaire du SNC.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.LA MISE EN PLACE DU TUBE NEURAL.....</b>	<b>6</b>
2.1.1. <i>La neurulation.....</i>	<i>6</i>
2.1.2. <i>Les cellules de crête neurale.....</i>	<i>8</i>
2.1.3. <i>La croissance du tube neural.....</i>	<i>9</i>
<b>2.2.LE CONTROLE DE LA PROLIFERATION DES PROGENITEURS NEURaux.....</b>	<b>9</b>
2.2.1. <i>Les régulateurs du cycle cellulaire.....</i>	<i>11</i>
2.2.1.1. <i>Les différentes phases du cycle cellulaire.....</i>	<i>11</i>
2.2.1.2. <i>Les différents complexes Cyclines/Cdks.....</i>	<i>12</i>
2.2.1.3. <i>La régulation des complexes Cyclines/Cdks.....</i>	<i>14</i>
2.2.1.4. <i>Les CKIs et la sortie du cycle cellulaire.....</i>	<i>16</i>
2.2.2. <i>La voie Notch.....</i>	<i>17</i>
2.2.2.1. <i>Le mécanisme d'inhibition latérale.....</i>	<i>18</i>
2.2.2.2. <i>La division asymétrique.....</i>	<i>23</i>
2.2.3. <i>Rôle des facteurs de transcription à domaine bHLH au cours de la neurogenèse.....</i>	<i>24</i>
2.2.3.1. <i>Définition des facteurs de transcription à domaine bHLH.....</i>	<i>24</i>
2.2.3.2. <i>Propriétés et classification des facteurs de transcription à domaine bHLH.....</i>	<i>25</i>
2.2.3.3. <i>Mise en évidence des gènes proneuraux et définition de la fonction proneurale.....</i>	<i>25</i>
2.2.3.4. <i>Identification des gènes proneuraux.....</i>	<i>26</i>
2.2.3.5. <i>Classification et fonctions générales des facteurs de transcription à bHLH, durant le développement du SNC.....</i>	<i>27</i>
2.2.3.6. <i>Rôle des gènes proneuraux dans la sortie de cycle et la différenciation neuronale.....</i>	<i>29</i>
2.2.3.7. <i>Les autres fonctions des facteurs de transcription à bHLH au cours de la mise en place du SNC.....</i>	<i>30</i>
<b>3. Polarisation du tube neural. ....</b>	<b>32</b>
<b>3.1.LES MECANISMES DE MISE EN PLACE DE L'AXE ANTEROPOSTERIEUR DU TUBE NEURAL.....</b>	<b>32</b>
3.1.1. <i>Rôle de la signalisation FGF.....</i>	<i>33</i>
3.1.2. <i>Rôle de la signalisation Acide Rétinoïque dans le patron d'expression AP.....</i>	<i>35</i>
3.1.3. <i>Rôle de la signalisation WNT dans le patron d'expression AP.....</i>	<i>37</i>
<b>3.2.LES MECANISMES DE MISE EN PLACE DE L'AXE DORSOVENTRAL DU TUBE NEURAL.....</b>	<b>38</b>

<b>4. La spécification des différents types neuronaux dans la moelle épinière embryonnaire.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.LES MECANISMES DE SPECIFICATION ET DE DIFFERENCIATION NEURONALE DANS LA MOELLE EPINIÈRE.....</b>	<b>40</b>
4.1.1. Spécification neuronale dans la partie dorsale de la moelle épinière.....	41
4.1.1.1. Les différentes populations neuronales dorsales.....	41
4.1.1.2. La signalisation BMP.....	43
4.1.2. Spécification neuronale dans la partie ventrale de la moelle épinière.....	45
4.1.2.1. La transduction du signal Sonic Hedgehog.....	48
4.1.2.2. Rôle de la signalisation BMP dans le patron d'expression ventral.....	54
4.1.2.3. Rôle de la signalisation FGF et Acide Rétinoïque dans le patron d'expression ventral.....	54
4.1.3. Contribution du code transcriptionnel dans la spécification des progéniteurs ventraux.....	56
4.1.4. La diversité neuronale dans la moelle épinière ventrale.....	58
<b>4.2.LA SPECIFICATION DES PROGENITEURS DU TERRITOIRE NKX6.1.....</b>	<b>59</b>
4.2.1. La spécification des motoneurones.....	59
4.2.2. Les différents sous-types de motoneurones.....	61
4.2.3. La spécification des interneurones V2.....	61
<b>5. Rôle de Gata2 au cours de la neurogenèse embryonnaire.....</b>	<b>64</b>
<b>5.1.GENERALITES.....</b>	<b>64</b>
<b>5.2.FONCTION DE GATA2 AU COURS DE LA NEUROGENESE.....</b>	<b>65</b>
<b>6. Bases du travail de thèse.....</b>	<b>68</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>72</b>
<b>1. Gata2 contrôle la prolifération des progéniteurs neuronaux.....</b>	<b>72</b>
<b>1.1.INTRODUCTION DE L'ARTICLE.....</b>	<b>72</b>
<b>1.1.ARTICLE.....</b>	<b>76</b>
<b>1.2.SYNTHESE DE L'ARTICLE.....</b>	<b>94</b>
<b>1.3.DISCUSSION.....</b>	<b>96</b>
1.3.1. Gata2 inhibe la prolifération cellulaire.....	96
1.3.2. Gata2 peut induire la différenciation neuronale in vivo.....	100
1.3.3. Quelle est la nature du ou des facteurs responsables de l'effet cellulaire non autonome ?.....	101
<b>1.4.CONCLUSION.....</b>	<b>104</b>
<b>2. Rôle de Gata2 dans la spécification des interneurones V2.....</b>	<b>106</b>
<b>2.1.INTRODUCTION DE L'ARTICLE.....</b>	<b>106</b>
<b>2.2.ARTICLE.....</b>	<b>110</b>
<b>2.3.RESULTATS SUPPLEMENTAIRES.....</b>	<b>144</b>
2.3.1. Localisation des interneurones V2a et V2b.....	145

2.3.2.	<i>Le système de neurotransmission des interneurons V2.</i>	146
2.3.2.1.	<i>Les interneurons V2a sont glutamatergiques.</i>	146
2.3.2.2.	<i>Les interneurons V2b sont GABAergiques.</i>	147
2.3.1.	<i>Gata2 induit la différenciation de neurones GABAergiques.</i>	147
<b>2.4.</b>	<b>SYNTHESE DES RESULTATS.</b>	<b>154</b>
<b>2.5.</b>	<b>DISCUSSION.</b>	<b>156</b>
2.5.1.	<i>La dichotomie V2a/V2b implique probablement une division asymétrique.</i>	156
2.5.2.	<i>Gata2 module les voies de signalisation Notch et TGFβ/Activine.</i>	157
2.5.3.	<i>Gata2 module la voie Shh et inhibe la différenciation des motoneurons.</i>	160
2.5.3.1.	<i>Gata2 module la signalisation Shh.</i>	160
2.5.3.2.	<i>Gata2 et l'inhibition du programme de différenciation des motoneurons.</i>	161
2.5.4.	<i>L'influence de Gata2 sur la spécification des autres populations neuronales.</i>	162
2.5.4.1.	<i>Effet de Gata2 sur la différenciation des interneurons V0 et V1.</i>	162
2.5.4.2.	<i>Effet de Gata2 dans le territoire de spécification des interneurons V3.</i>	163
2.5.4.3.	<i>Effet de Gata2 sur la différenciation des interneurons dorsaux.</i>	164
2.5.5.	<i>Gata2 induit la différenciation de neurones GABAergiques dans la moelle épinière.</i>	165
<b>2.6.</b>	<b>CONCLUSION.</b>	<b>166</b>
<b>DISCUSSION.</b>		<b>168</b>
<b>1.</b>	<b>Gata2 est un gène de spécification.</b>	<b>170</b>
1.1.	<b>GATA2 REGULE LA PROLIFERATION DES PROGENITEURS NEURONAUX.</b>	<b>170</b>
1.2.	<b>GATA2 CONTROLE LA MISE EN PLACE DES INTERNEURONES V2.</b>	<b>170</b>
<b>2.</b>	<b>Les limites expérimentales.</b>	<b>172</b>
2.1.	<b>LES EXPERIENCES EN CONTEXTE DE GAIN DE FONCTION.</b>	<b>172</b>
2.1.1.	<i>Le choix du stade d'électroporation.</i>	173
2.1.2.	<i>Les limites de l'utilisation des vecteurs plasmidiques.</i>	173
2.1.3.	<i>Les vecteurs rétroviraux.</i>	174
2.2.	<b>LES EXPERIENCES EN CONTEXTE DE PERTE DE FONCTION.</b>	<b>174</b>
2.2.1.	<i>Les limites du modèle de souris Gata2<sup>-/-</sup>.</i>	174
2.2.2.	<i>L'utilisation d'une stratégie Cre-lox, pour invalider Gata2 dans le système nerveux.</i>	175
2.2.3.	<i>L'inhibition de l'expression de Gata2 par RNAi.</i>	175
2.3.	<b>L'AMELIORATION DES MARQUAGES HISTOCHIMIQUES.</b>	<b>176</b>
<b>CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES.</b>		<b>178</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>		<b>182</b>



## ABREVIATIONS

De nombreux termes en anglais, couramment utilisés et difficiles à traduire sans en dénaturer le sens, seront en italiques. Les noms latins désignant une structure anatomique seront également en italique. Les abréviations désignant des noms propres, des facteurs de transcription ou des lignées cellulaires par exemple, ne seront pas toutes détaillées.

ADN	Acide desoxyribonucléique
AR	Acide Rétinoïque
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Asc	<i>Achaete Scute</i>
Ato	<i>Atonal</i>
Axe AP	Axe antéropostérieur
Axe DV	Axe dorso ventral
bHLH	<i>Basic helix loop helix</i> (basique hélice boucle hélice)
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMPRI	Récepteur BMP de type I
BMPRII	Récepteur BMP de type II
CAK	<i>Cdk activating kinase</i> (kinase activatrice de Cdk)
Cdk	<i>Cyclin dependant kinase</i> (kinase cycline dépendante)
Chx10	<i>ceh-10 homeo domain containing homolog -1</i>
Ci	<i>Cubitus interruptus</i>
CINs	<i>Commissural interneurons</i> (interneurones commissuraux)
CKIs	<i>Cyclin kinase inhibitors</i> (inhibiteurs des kinases de cyclines)
CSL	<i>C-promotor binding factor/suppressor of hairless/Lag1</i>
Cos 2	<i>Costal-2</i>
Dll1,3,4	Ligands Delta 1, 3, 4
En1	<i>Engrailed 1</i>
EnR	Domaine répresseur Engrailed de drosophile
Evx1/2	<i>Even skipped homeobox 1/2</i>

---

FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR	<i>FGF receptor</i> (récepteur au FGF)
FoxN4	<i>Forkhead box N4</i> (Facteur de transcription de type <i>Forkhead</i> ou <i>Winged helix</i> )
FP	<i>Floor plate</i> (plaque du plancher)
Fu	<i>Fused</i>
GMC	Cellule mère précurseur des ganglions ( <i>Ganglion mother cell</i> )
GSK3	Glucose synthase kinase 3
HA	Hémagglutinine
Hb9	<i>Homeobox gene 9</i> (ou Hlxb9)
HD	Homéodomaine
HERP	<i>HES related repressor protein</i> (répresseur apparenté aux HES)
HES	<i>Hairy et enhancer of split</i>
HLH	<i>Helix loop helix</i> (motif hélice boucle hélice)
Ia-INs	<i>Interneurones inhibiteurs Ia</i>
INs	Interneurones
Isl1/2	<i>Islet 1/2</i>
Jag1,2	Ligands Jagged1, 2
Lhx3	<i>LIM homeobox 3</i> (ou Lim3)
Lhx1/5	<i>LIM homeobox 1/5</i> (ou Lim1/2)
LMC	<i>Lateral motor column</i> (colonne moteur latérale)
Mash1	<i>Mouse achaete scute homolog 1</i> (ou Ascl1)
Math1	<i>Mouse atonal homolog 1</i>
MN	Motoneurone
MNR2	<i>Motor neuron restricted 2</i>
MPF	<i>M phase promoting factor</i>
Ngn	Neurogénines
NICD	<i>Notch intracellular domain</i> (domaine intracellulaire de Notch)
OPC	Précurseurs des oligodendrocytes ( <i>Oligodendrocyte precursor cell</i> )
PKA	Protéine kinase A
PMC	Mésoderme paraxial caudal
pMN	Domaine des progéniteurs des motoneurones
Ptc	Récepteur Patched

---

RALDH-2	Rétinaldéhyde deshydrogénase 2
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i> (Récepteur acide rétinoïque)
Rb	Rétinoblastome
RBPJ $\kappa$	<i>Recombining binding protein J kappa</i>
RCs	<i>Renshaw cells</i> (cellules de Renshaw)
RNAi	ARN interférence
RP	<i>Roof plate</i> (toit)
SHH	<i>Sonic hedgehog</i>
Sim1	<i>Single mimerd 1</i>
Smad	Protéines apparentées aux protéines SMA et MAD.
Smo	Protéine Smoothened
SNA	Système nerveux autonome
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOP	Précurseurs des organes sensoriels ( <i>Sensory organ precursor</i> )
SuFu	<i>Suppressor of fused</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
VP16	Domaine transactivateur fort du virus herpes simplex type II
WNT	<i>Wingless integrated</i>
ZM	Zone marginale ou zone du manteau
ZSV	Zone sous ventriculaire
ZV	Zone ventriculaire





## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1  FORMATION DU TUBE NEURAL AU COURS DE LA NEURULATION.....	7
FIGURE 2  COUPE TRANSVERSALE DU TUBE NEURAL EMBRYONNAIRE.....	10
FIGURE 3  DIAGRAMME RECAPITULATIF DE L'HISTORIQUE DES EVENEMENTS DURANT LA NEUROGENESE.....	10
FIGURE 4  REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE CELLULAIRE.....	13
FIGURE 5  SCHEMA REPRESENTATIF DES PRINCIPAUX REGULATEURS IMPLIQUES DANS LA SORTIE DU CYCLE CELLULAIRE. ..	15
FIGURE 6  LA VOIE NOTCH MAINTIEN L'EQUILIBRE ENTRE PROLIFERATION ET DIFFERENCIATION NEURONALE PAR LE MECANISME D'INHIBITION LATERALE.....	20
FIGURE 7  MECANISME D'ACTIVATION DE LA VOIE NOTCH.....	22
FIGURE 8  MECANISMES DE REPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE PAR LES HES.....	22
FIGURE 9  LA FONCTION PRONEURALE SIMILAIRE CHEZ LES INVERTEBRES ET LES VERTEBRES ?.....	28
FIGURE 10  STRUCTURE ET PROPRIETES DES PROTEINES NEURALES A BHLH.....	28
FIGURE 11  VOIE DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DES FGFS.....	34
FIGURE 12  PATRON DORSAL D'EXPRESSION GENETIQUE DE LA MOELLE EPINIERE.....	42
FIGURE 13  VOIE DE SIGNALISATION DES BMPs.....	42
FIGURE 14  L'EXPRESSION DE SHH PAR LA NOTOCHORDE ET LA FLOOR PLATE PAR RAPPORT AU PATRON D'EXPRESSION VENTRAL DU TUBE NEURAL.....	47
FIGURE 15  REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VOIE SONIC HEDGEHOG (SHH).....	50
FIGURE 16  LE GRADIENT SONIC HEDGEHOG MODULE L'EXPRESSION DES FORMES ACTIVATEURS ET REPRESSEURS DES PROTEINES GLIS ET SE TRADUIT PAR L'EMERGENCE DE TYPES CELLULAIRES DISTINCTS.....	50
FIGURE 17  SCHEMA RESUMANT LES INTERACTIONS GENIQUES BASIQUES NECESSAIRES A LA MISE EN PLACE DU PATRON D'EXPRESSION VENTRAL DU TUBE NEURAL.....	53
FIGURE 18  LA SIGNALISATION SONIC HEDGEHOG CONTROLE LE PATRON D'EXPRESSION VENTRAL ET LA SPECIFICATION DE L'IDENTITE DES NEURONES VENTRAUX.....	53
FIGURE 19  SPECIFICATION DE L'IDENTITE DES SOUS-TYPES NEURONAUX DANS LA MOELLE EPINIERE EMBRYONNAIRE.....	57
FIGURE 20  PATRON D'EXPRESSION DU GENE GATA2 CHEZ L'EMBRYON DE SOURIS.....	66
FIGURE 21  EXPRESSION DE GATA2 DANS LE TUBE NEURAL.....	66
FIGURE 22  COMPARAISON DES PATRONS D'EXPRESSION DE CHX10 ET GATA3.....	150
FIGURE 23  COMPARAISON DES PATRONS D'EXPRESSION DE CHX10 ET GATA3, PAR RAPPORT AUX PATRONS D'EXPRESSION DE VGLUT2 ET GAD67.....	151
FIGURE 24  LES INTERNEURONES V2A SONT GLUTAMATERGIQUES ET LES INTERNEURONES V2B SONT GABAERGIQUES.....	151
FIGURE 25  GATA2 INDUIT LA DIFFERENCIATION DE NEURONES GABAERGIQUES AUX DEPENS DES NEURONES GLUTAMATERGIQUES.....	152
TABLEAU 1  TABLEAU RECAPITULATIF DES PRINCIPALES CDKS ET CYCLINES ET DE LEUR FONCTION.....	13



## **AVANT-PROPOS**





## AVANT-PROPOS

*Le laboratoire de génétique moléculaire de la neurotransmission et des processus neurodégénératifs (LGN) dirigé par Jacques MALLET, est spécialisé dans l'étude des mécanismes génétiques et moléculaires, à l'origine des maladies neurodégénératives du système nerveux.*

*Dans le laboratoire, le groupe « Développement neuronal et cellules souches » animé par Jeannette NARDELLI et Philippe RAVASSARD s'intéresse aux mécanismes de spécification de certaines populations neuronales dans la partie ventrale de la moelle épinière embryonnaire, plus particulièrement des interneurons V2 et V3, ainsi qu'aux cellules souches pancréatiques.*

*Au sein de ce groupe, sous l'encadrement de Jeannette NARDELLI, les travaux de ma thèse ont porté sur l'étude fonctionnelle du gène *Gata2* durant la neurogenèse dans la moelle épinière embryonnaire et plus spécifiquement sur les mécanismes de spécification d'une population d'interneurons ventraux, les interneurons V2.*

*A mon arrivée dans l'équipe de Jeannette NARDELLI, les données acquises suggéraient d'une part que, dans la moelle épinière embryonnaire, *Gata2* contrôlait la prolifération et la sortie de cycle des progéniteurs neuronaux, d'autre part, que *Gata2* participait également aux mécanismes de spécification et de dichotomie des interneurons V2 (V2a et V2b).*

*Nos objectifs ont été d'éclaircir le rôle de *Gata2* en rapport avec le cycle cellulaire et de mieux comprendre la fonction de ce gène au cours de la spécification des V2.*

*Pour atteindre ces objectifs, nous avons mené notre analyse fonctionnelle en contexte de perte et de gain de fonction pour *Gata2*, respectivement chez des embryons de souris dans lesquels le gène *Gata2* est invalidé et chez l'embryon de poulet, par électroporation de la moelle épinière embryonnaire avec un vecteur permettant l'expression de *Gata2*.*

*Enfin, nous avons étendu cette étude fonctionnelle de *Gata2* à la caractérisation des dérivés des progéniteurs neuronaux exprimant *Gata2* dans la moelle épinière au cours du développement embryonnaire. Pour cela, nous avons choisi une stratégie Cre-lox chez la souris et nous avons généré des souris transgéniques dans lesquelles les progéniteurs *Gata2+* et tous leurs dérivés dans la moelle épinière sont marqués en permanence.*

*L'analyse de ces souris devrait permettre d'établir le lignage des progéniteurs Gata2+ au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte.*

*Avant de présenter les résultats obtenus à l'issu de mon stage doctoral, je ferai un rappel introductif des principaux mécanismes génétiques et moléculaires impliqués dans la mise en place du système nerveux central ainsi que des notions de spécification et de différenciation neuronale. Cette introduction sera suivie de la présentation des objectifs et de la stratégie choisie. Les résultats obtenus durant mon stage doctoral seront présentés en deux parties :*

*Au cours de la première partie, nous avons étudié la fonction de Gata2 en rapport avec le contrôle de la prolifération des progéniteurs neuronaux. Cette étude a été réalisée par des expériences de gain de fonction de Gata2 dans le tube neural d'embryon de poulet afin de déterminer les effets induits par la surexpression de Gata2. Par ailleurs, ces expériences en contexte de gain de fonction ont permis de compléter les observations chez l'embryon de souris dépourvu de Gata2.*

*Pour la seconde partie, nous avons cherché à mieux comprendre le rôle de Gata2 au cours des mécanismes de spécification des interneurones V2 et sa contribution dans la dichotomie des interneurones V2.*

# **INTRODUCTION**







## INTRODUCTION

### **1. Généralités sur le système nerveux.**

Le système nerveux des vertébrés est un tissu très complexe, qui comprend le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP). Le système nerveux central est composé de l'encéphale et de la moelle épinière. Le système nerveux périphérique comprend le système sensoriel (ganglions rachidiens) ainsi que les extensions nerveuses en dehors du SNC (nerfs sensitifs notamment) et le système nerveux autonome. Le système nerveux autonome (SNA) comprend le système sympathique, le système parasympathique et le système entérique qui contrôlent l'activité sensitive et motrice viscérale telle que la respiration, le métabolisme.

Le système nerveux central est un tissu qui présente une très grande hétérogénéité. En effet, il est constitué de multiples types cellulaires aux fonctions variées que l'on peut classer dans deux grandes catégories : les neurones et les cellules gliales. La compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires responsables de la mise en place des différents types cellulaires constituant le système nerveux (différents types neuronaux et gliaux), constitue un des enjeux majeurs en biologie du développement.

La mise en place du système nerveux des vertébrés est un long processus d'organogenèse appelé neurogenèse, qui débute très tôt au cours du développement embryonnaire, pour se prolonger et s'achever après la naissance. Durant le développement embryonnaire, l'ensemble des constituants du SNC (cellules gliales et cellules neuronales) est dérivé du tube neural. La mise en place du SNC est un processus complexe mettant en jeu de nombreux mécanismes tels que l'induction neurale, la prolifération cellulaire, la communication intercellulaire, la spécification des multiples types cellulaires, la mort cellulaire programmée, la différenciation neuronale et la migration cellulaire. Ces divers mécanismes nécessitent une bonne coordination et une régulation très fine dans le temps et dans l'espace, indispensable au bon développement et au bon fonctionnement du système nerveux.

## **1.1. Les neurones.**

Les neurones sont des cellules différenciées hautement spécialisées, organisées en réseaux très complexes. Le neurone est considéré comme étant l'unité fonctionnelle du SNC. Il existe de multiples types de cellules neuronales ayant des fonctions spécifiques, dépendantes de la localisation des neurones dans le système nerveux. Le neurone est composé du corps cellulaire ou péricaryon et de nombreux prolongements. On distingue deux types de prolongements, les dendrites et l'axone qui véhiculent l'influx nerveux. Les dendrites sont de très nombreux prolongements ramifiés, qui conduisent l'influx nerveux afférent. Le neurone possède un unique axone qui est un prolongement conduisant l'influx nerveux efférent. L'axone est entouré par la gaine de myéline qui est formée par les oligodendrocytes dans le SNC. Enfin, dans les circuits neuronaux, les neurones communiquent entre eux par l'intermédiaire de signaux électriques et de signaux chimiques appelés neurotransmetteurs. Ces neurotransmetteurs peuvent avoir un effet « activateur » ou « inhibiteur » sur leurs cibles. Ils sont caractéristiques de la fonction du type neuronal.

## **1.2. Les cellules gliales.**

Dans le système nerveux des mammifères, les cellules gliales sont dix fois plus nombreuses que les neurones. Elles comprennent les cellules de la macroglie et les cellules de la microglie. Parmi les cellules de la macroglie on distingue, les oligodendrocytes, les astrocytes, les cellules épendymaires, les pituicytes, les tanicytes et les pinéalocytes qui dérivent des glioblastes du tube neural embryonnaire, et les cellules de Schwann (SNP) qui dérivent des cellules de la crête neurale de l'embryon.

Dans le SNC, les cellules de la macroglie assurent le maintien de l'homéostasie du milieu neuronal (soutien, maintien de la composition du milieu extracellulaire, nutrition...). Elles sont également à l'origine de la mise en place de la barrière hémato-

encéphalique permettant l'isolement des neurones du reste de l'organisme. De plus, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann produisent la gaine de myéline qui entourent les axones, afin d'accélérer la transmission de l'influx nerveux.

Enfin, les cellules de la microglie appartiennent au système monocyte/macrophage et dérivent des précurseurs embryonnaires des cellules sanguines. Ce sont les cellules présentatrices d'antigènes du SNC ayant la capacité de phagocytose quand elles sont activées et elles assurent essentiellement la protection immunitaire du SNC.

En résumé, le système nerveux présente une grande diversité cellulaire qui est nécessaire à ses multiples fonctions. La compréhension des mécanismes par lesquels sont mis en place l'ébauche du SNC, puis cette grande diversité cellulaire, ont constitué un énorme challenge en biologie du développement.



## **2. Le développement embryonnaire du SNC.**

L'ébauche et la construction du SNC sont basées sur trois étapes fondamentales :

- ❖ La neurulation.
- ❖ La spécification des différents types cellulaires.
- ❖ La différenciation neuronale.

### **2.1. La mise en place du tube neural.**

#### **2.1.1. La neurulation.**

Durant le développement embryonnaire, le SNC des vertébrés se forme à la fin de la gastrulation, à partir d'un feuillet épithélial simple appelé neurectoderme. Cette étape du développement embryonnaire est appelée neurulation. La neurulation est subdivisée en deux étapes, la neurulation primaire et la neurulation secondaire. Alors que la neurulation primaire concerne la mise en place du tube neural (sous l'effet de signaux inducteurs provenant du mésoderme, la plaque neural s'invagine et forme le tube neural), la neurulation secondaire concerne le développement de la partie la plus caudale du tube neural (Smith et Schoenwolf, 1997).

Au cours de la neurulation primaire, suite à l'induction neurale, les cellules du neurectoderme vont s'orienter principalement vers un destin neural et former la plaque neurale (neuroépithélium). Sous l'effet d'une succession d'interactions entre des gradients morphogénétiques (signaux inducteurs), la plaque neurale se forme dans la partie rostrale de l'embryon. Puis, la plaque neurale s'étend vers la partie caudale et s'épaissit. Enfin, sous l'influence de différents signaux inducteurs extrinsèques provenant principalement du mésoderme axial, la plaque neurale subit un processus d'invagination.

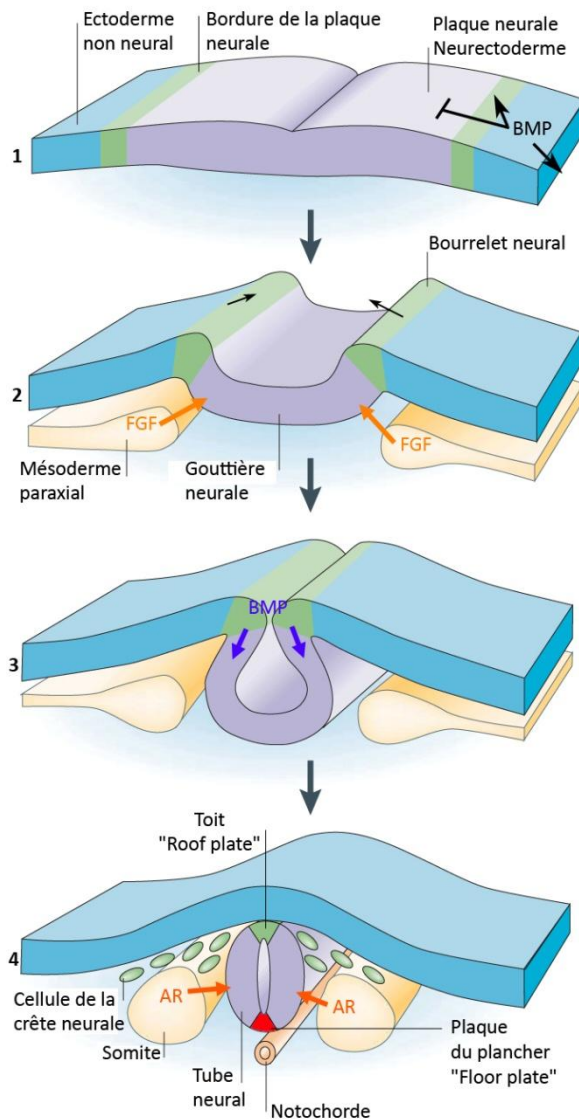


Figure 1| **Formation du tube neural au cours de la neurulation.**

(Adapté d'après Gammill et Bronner-Fraser, 2003)

Le système nerveux central (SNC) est généré à partir d'un épithélium spécialisé, la plaque neurale (1). Le processus de neurulation est basé sur l'inhibition de la signalisation des BMPs (Bone Morphogénétique protein). La gouttière neurale est produite par l'invagination de la plaque neurale qui est induite au niveau d'un point distinct des bourrelets neuraux, dans la région ventrale (Cellules de la plaque du plancher) (2). A la fin de la neurulation, les bordures latérales de la gouttière neurale vont fusionner (Wine-Lee *et coll.*) et ségréger le tube neural, de l'épithélium non-neural (4). Les cellules du toit (Roof plate) deviennent alors un centre organisateur qui produira des BMPs nécessaires au patron d'expression dorsal. Les cellules des crêtes neurales dérivant du tube neural dorsal vont migrer et former le système nerveux périphérique (SNP), les mélanocytes et le cartilage de la tête. Les cellules de la plaque du plancher (floor plate) produisent le morphogène Sonic Hedgehog (SHH) nécessaire au patron d'expression ventral.

Ce processus aboutit à la formation de la gouttière neurale et des bourrelets neuraux. Progressivement, les bourrelets neuraux se rapprochent et fusionnent afin de former le tube neural (Colas et Schoenwolf, 2001) (Figure 1).

### **2.1.2. Les cellules de crête neurale.**

Lors de la fermeture de la gouttière neurale, les cellules localisées au niveau de la jonction neurectoderme/ectoderme constituent les cellules des crêtes neurales. Ces cellules se détachent puis prolifèrent et migrent progressivement en profondeur. L'ensemble des cellules de la crête neurale constitue des populations hétérogènes de cellules multipotentes, présentant une capacité migratoire importante et une grande diversité phénotypique puisqu'elles génèrent de nombreux types cellulaires au cours du développement. En effet, suivant leur position dans l'axe antéropostérieur, elles peuvent être subdivisées en quatre grandes populations, crâniennes, cardiaques, vagues et thoraco-lombaires. Les cellules de la crête neurale crânienne produisent des cellules cartilagineuses ou osseuses, des cellules du tissu conjonctif, des cellules pigmentaires, les neurones efférents et les neurones des ganglions parasympathiques. Les cellules de la crête neurale cardiaque colonisent le septum aortico-pulmonaire en générant les muscles lisses de l'arc aortique, et les neurones du système parasympathique cardiaque. Les cellules de la crête neurale vagale produisent la majorité des neurones et cellules gliales qui constituent le système nerveux entérique tandis que les cellules de la crête neurale thoraco-lombaire se différencient d'abord en neurones et cellules gliales du SNP, puis en cellules pigmentaires de la peau. Il existe également une petite sous population de la partie la plus caudale de la crête neurale thoraco-lombaire, appelée crête neurale sacrée qui contribue au système nerveux entérique dans l'intestin postérieur caudal.

En résumé, les différentes populations de cellules multipotentes constituant la crête neurale génèrent l'ensemble des cellules du SNP (neurones des ganglions rachidiens, neurones des ganglions sympathiques, neurones du système nerveux entérique, cellules gliales du SNP, cellules de Schwann,...) ainsi que les cellules des cartilages, cellules pigmentaires de la peau,... (Pour Revue ; Bronner-Fraser, 1995 ; Barembaum et Bronner-Fraser, 2005 ; Crane et Trainor, 2006).



### **2.1.3. La croissance du tube neural.**

La mise en place de tous les composants du SNC (l'encéphale et la moelle épinière en particulier) à partir du tube neural nouvellement formé, implique des vagues successives de croissance du tube neural suivant l'axe rostro-caudal, qui nécessitent une prolifération active. D'ailleurs, l'ébauche du tube neural est constituée d'un neuroépithélium prismatique pseudostratifié, composé de cellules neurales pluripotentes. Les cellules neurales encore appelées progéniteurs neuraux, sont des cellules indifférenciées à fort potentiel mitotique qui s'étendent sur toute l'épaisseur de la plaque neurale. Les progéniteurs neuraux en prolifération, seront ensuite restreints à la partie médiane du tube neural, appelée la zone ventriculaire (ZV), tandis que les cellules neuronales post-mitotiques seront restreintes à la zone marginale ou zone du manteau (ZM) (Figure 2).

## **2.2. Le contrôle de la prolifération des progéniteurs neuraux.**

Le développement du SNC embryonnaire est accompagné d'une prolifération importante, nécessaire à la production, par vagues successives, des nombreux dérivés neuraux présents dans le système nerveux. Ces dérivés doivent être générés en nombre suffisant et à des positions bien définies, selon une séquence temporelle bien définie. Ainsi, le développement harmonieux du SNC implique le contrôle de la prolifération des progéniteurs neuraux, afin d'assurer une bonne coordination entre la sortie de cycle et la différenciation.

En effet, au cours du développement du SNC, il existe différents modes de régulation de la prolifération des progéniteurs neuraux. Au stade plaque neurale (neuroépithélium simple), la prolifération des cellules neurales est contrôlée principalement par des signaux morphogénétiques (FGFs, BMPs,...). Dès que la neurogenèse démarre, d'autres modes de régulation contrôlent la prolifération. Certains progéniteurs neuronaux prolifèrent tandis que d'autres sortent du cycle et se différencient suite à l'induction des gènes neurogéniques et proneuraux. Ainsi, il existe un équilibre entre prolifération et différenciation.

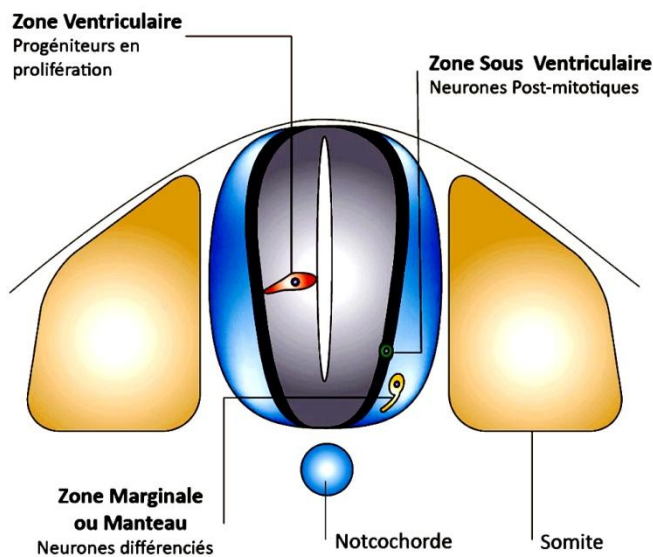


Figure 2| Coupe transversale du tube neural embryonnaire.

(Adapté d'après Diez del Corral et Storey, 2001)

Les cellules en prolifération sont localisées dans la zone ventriculaire (ZV) tandis que les cellules post mitotiques sont situées dans la zone sous ventriculaire (ZSV) et les neurones différenciés sont dans la zone marginale (ZM ou zone du manteau).

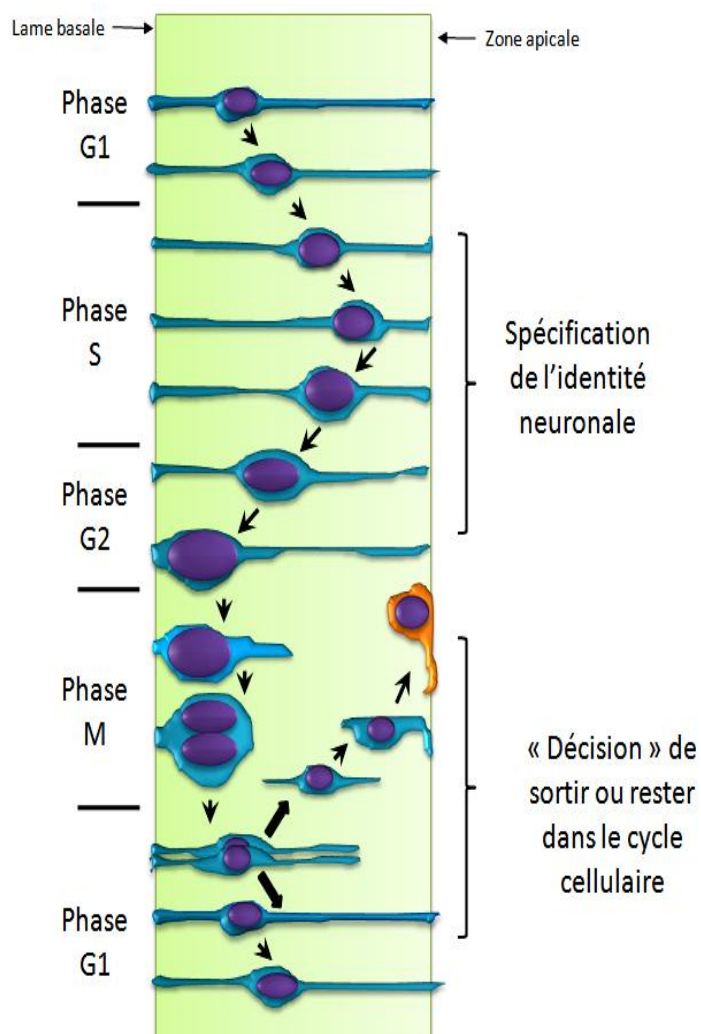


Figure 3| Diagramme récapitulatif de l'historique des événements durant la neurogenèse.

Le schéma représente une portion entière de tube neural embryonnaire montrant des cellules individuelles à divers stades du cycle cellulaire. La Zone Ventriculaire (ZV) est située à gauche et la Zone du Manteau (ZM) est située à droite, sur le diagramme. Les noyaux des cellules en prolifération subissent la migration nucléaire interkinétique qui est coordonnée avec les phases du cycle cellulaire. Les noyaux migrent de la ZV vers la ZM au cours de la phase G1 et ils subissent également la réplication de l'ADN durant la phase S dans la moitié externe de la ZV. Le noyau retourne vers la ZV durant la phase G2 où il entre en mitose (phase M). Les cellules neuroépithéliales sont connectées entre elles par des jonctions adhérentes. Durant la dernière phase S et la phase G2, les cellules en prolifération acquièrent des informations de l'environnement, qui spécifient la destinée des cellules. Après une mitose complète et retour en phase G1, les cellules « décident » soit de sortir du cycle et de se différencier, soit de rester dans le cycle cellulaire.

Cet équilibre permet le maintien d'un pool de progéniteurs neuraux, nécessaire au développement complet du SNC. Cette balance entre prolifération cellulaire et différenciation des progéniteurs neuraux est contrôlée par différents mécanismes impliquant des signaux intrinsèques et extrinsèques.

### **2.2.1. Les régulateurs du cycle cellulaire.**

#### ***2.2.1.1. Les différentes phases du cycle cellulaire.***

Le cycle cellulaire comporte quatre phases principales, la phase G1 (phase de croissance), la phase S (phase de réplication de l'ADN), la phase G2 (seconde phase de croissance) et la phase M (phase de la division cellulaire ou mitose). Les cellules engagées dans le cycle cellulaire se divisent chacune en deux cellules filles qui pourront recommencer un nouveau cycle ou sortir du cycle puis entrer dans la phase G0 afin de devenir quiescente et s'engager dans un processus de différenciation (Figure 4). La décision d'une cellule de s'engager dans le cycle cellulaire ou de quitter le cycle cellulaire s'effectue au début de la phase G1 et cette décision est influencée par l'action de signaux mitogènes.

Dans le tube neural, la position des cellules et en particulier de leur noyau, suivant l'axe médio-latéral, est étroitement lié à leur état (prolifératif ou non). Ainsi, les noyaux des progéniteurs neuraux migrent le long de l'axe apico-basal du tube et la position des noyaux dans l'axe apico-basal est coordonnée avec les différents stades du cycle cellulaire. En effet, les noyaux des cellules en prolifération subissent la migration nucléaire interkinétique coordonnée avec les quatre phases du cycle cellulaire. Les noyaux s'éloignent progressivement de la zone ventriculaire vers la zone sous ventriculaire pendant la phase G1 et la phase S (étape de synthèse de l'ADN). Ensuite, durant la phase G2, les noyaux migrent vers la lumière du tube neural où les cellules entrent en mitose (phase M). Enfin, les cellules filles issues de la mitose peuvent alors poursuivre leur progression dans le cycle cellulaire ou sortir du cycle cellulaire, s'engager dans une voie de différenciation donnée et migrer vers la zone du manteau encore appelée zone marginale (Hollyday, 2001) (Figures 2,3).

### 2.2.1.2. Les différents complexes Cyclines/Cdks.

La progression des cellules dans le cycle cellulaire est dépendante de la formation, de l'activation et de l'inactivation séquentielle d'une série de régulateurs du cycle cellulaire. Ces régulateurs ont été identifiés et sont constitués de complexes de Cyclines et de protéines kinases Cycline dépendante (Cdk). Il existe plusieurs types de Cyclines et de Cdks pouvant s'associer et former des complexes Cycline/Cdk (Tableau 1). A chacune des quatre phases du cycle est associé un type de complexe Cycline/Cdk, et à chaque transition d'une phase du cycle à une autre, est également associé un « check point » ou point de contrôle (Pour revue ; Zetterberg *et coll.*, 1995 ; Hoffmann, 2006). Il existe donc quatre points de contrôle du cycle cellulaire, les points R (phase G1), S (phase S), T (phase G2) et A (phase M).

La progression des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée au niveau des différents points de contrôle et implique des régulateurs de la formation et ou de l'activation des différents complexes Cycline/Cdk (Pour revue ; Ohnuma *et coll.*, 2001).

Ainsi, la progression en phase G1 nécessite la formation et l'activation des complexes Cyclines D/Cdk4 et Cyclines D/Cdk6. La synthèse et l'activation de ces complexes sont régulées au point de contrôle R, essentiellement par les signaux mitogènes ou facteurs de croissance, dont l'action est médiée essentiellement par les protéines Ras et Myc.

Le contrôle de la transition G1/S au point R implique plusieurs protéines régulatrices dont la protéine du rétinoblastome (Rb). En début de phase G1, la protéine Rb est associée aux facteurs de transcription E2F et DP1, et inhibe leur fonction. La phosphorylation de la protéine Rb (pRb) par les complexes Cyclines D/Cdk4-6 induit l'inactivation de Rb. Cette inactivation de la protéine Rb par phosphorylation entraîne la libération massive des facteurs de transcription E2F et DP1 qui contrôlent l'expression des gènes nécessaires à la transition G1/S et à la progression en phase S (induction de l'expression de la Cycline E).

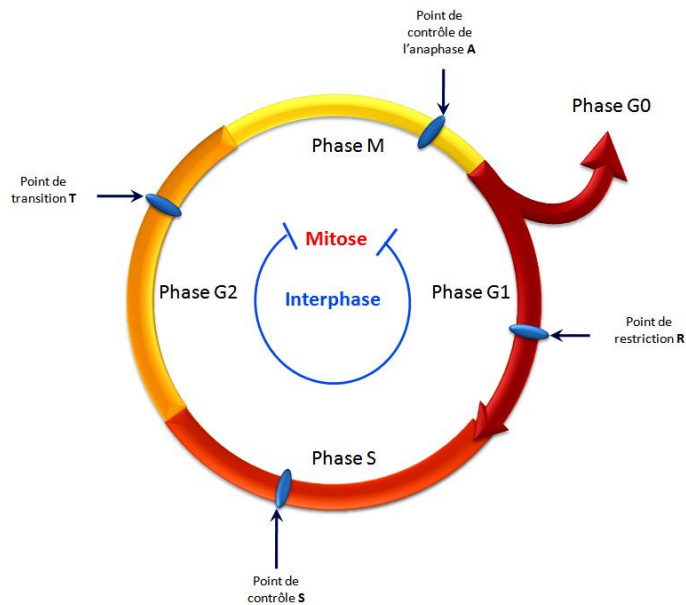


Figure 4| **Représentation schématique du cycle cellulaire.**

Le cycle cellulaire comprend 4 phases et 4 points de contrôle ou « check point ». La phase G1 marque le début du cycle cellulaire et la croissance cellulaire tandis que la phase S est la période de réplication de l'ADN. La phase G2 est la seconde phase de croissance nécessaire au doublement des constituants cellulaires qui précède la mitose ou phase M. A la phase M, la cellule mère se divise en 2 cellules filles qui peuvent poursuivre à nouveau leur progression dans le cycle cellulaire ou sortir du cycle et entrer en phase G0 ou état de quiescence.

Tableau 1| **Tableau récapitulatif des principales Cdks et Cyclines et de leur fonction.**

(Adapté d'après Malumbres et Barbacid, 2005)

<i>Symboles Cdks</i>	<i>Principales cyclines activées</i>	<i>Interactions avec d'autres protéines</i>	<i>Principaux substrats</i>	<i>Fonctions</i>
<b>Cdk1</b>	<b>A1, A2, B1, B2 (E3, B3)</b>	Cks	Cdc7, Cdc20, Cdc25A, Cdc25 C, Cdh1, Cdk7, C/EBPb, CKII, Dynein, Dystrophine, EF-1, Fos, GFAP, Histone H1, HMG-I(Y), IFAP300, Lamines A, B, C, Nir2, Npm, NPC, Nucleolin, Nucks, Numatrine, Orc1, p18, pRb, R2, Rab4, Survivin, Tau, vimentin, thymidine kinase	<b>Cycle cellulaire (G2 – M)</b>
<b>Cdk2</b>	<b>A1, A2, E1, E2 (D1, D2, B1, B3)</b>		p107, p21Cip1, p27Kip1, p53, pRb, R2, RPA, Smad3, thymidine kinase	<b>Cycle cellulaire (G1 – S)</b>
<b>Cdk3</b>	<b>E1, E2, A1, A2, C</b>	E2F/DP	Cables1	<b>Cycle cellulaire (G0 – G1 – S)</b>
<b>Cdk4</b>	<b>D1, D2 D3</b>	MyoD	Cdt1, Marcks, p107, p130, pRb, Smad3	<b>Cycle cellulaire (G1 – S)</b>
<b>Cdk5</b>	Types D, E, G, p35, p39		Amphiphysin1, Cables, Disabled1, Doublecortin, Munc18, Nudel, p53, Pctaire1, Stat3, tyrosine hydroxylase	Senescence Neurones post-mitotiques
<b>Cdk6</b>	<b>D1, D2, D3</b>		p107, p130, pRb	<b>Cycle cellulaire (G1 – S)</b>
<b>Cdk7</b>	H		Cdk1-6, p53, RARγ, ARN pol.II	Kinase activatrice de Cdk, transcription
<b>Cdk8</b>	C (K?)		ARN pol.II	Transcription
<b>Cdk9</b>	T1, T2, K		pRb, ARN pol.II	Transcription
<b>Cdk10</b>	Inconnues	Ets2	Inconnus	<b>Transcription Cycle cellulaire (G2 – M)</b>
<b>Cdk11</b>	<b>L1, L2 (D)</b>	Ck2, eIF3, ARN pol.II	Cycline L	<b>Transcription Cycle cellulaire (M)</b>

Le passage à la phase S est associé à la formation et à l'activation du complexe Cycline E/Cdk2 qui à son tour est responsable de l'hyperphosphorylation de Rb et initie la réplication de l'ADN. La poursuite de la réplication de l'ADN durant la phase S nécessite l'activation du complexe Cycline A/Cdk2. Ce complexe contrôle la durée de la phase S, inactive les facteurs de transcription de la phase G1 (facteurs E2F et DP1) en les phosphorylant et induit également l'arrêt de la dégradation de la Cycline B qui sera nécessaire à la transition G2/M.

En effet, la transition de phase G2/M est contrôlée au point de contrôle T, par l'activation du complexe Cycline B/Cdk1 appelé également MPF (Mitosis Promoting Factor). Le complexe Cycline B/Cdk1 est activé par la protéine kinase CAK (Cdk Activating Kinase) et par les protéines phosphatases activatrices Cdc25B et Cdc25C. L'inactivation du complexe Cycline B/Cdk1 se fait par l'intermédiaire des protéines kinases inhibitrices Wee1, Mik1 et Myt1 (Rhind et Russell, 2001 ; Stark et Taylor, 2006). L'activation du complexe Cycline B/Cdk1 induit à son tour la phosphorylation de nombreux substrats liés à l'entrée en mitose, dont les lamines nucléaires (permet la dissociation de l'enveloppe nucléaire nécessaire à la mitose), les nombreuses protéines kinases et les protéines phosphatases, responsables de la formation du fuseau mitotique et de la cytokinèse (Pour revue ; Malumbres et Barbacid, 2005).

### ***2.2.1.3. La régulation des complexes Cyclines/Cdks.***

L'activité des différents complexes Cyclines/Cdks qui contrôlent la progression dans le cycle cellulaire est finement régulée à différents niveaux (au niveau transcriptionnel, dégradation cyclique des Cyclines, ...) par de nombreuses protéines régulatrices. Ainsi, les différentes Cyclines sont présentes à des taux variables dans la cellule, en fonction des différentes étapes du cycle cellulaire. Le contrôle de leur synthèse au cours du cycle et de leur dégradation dans le protéasome après ubiquitination constitue une partie du système de régulation de la formation du complexe Cycline/Cdk.

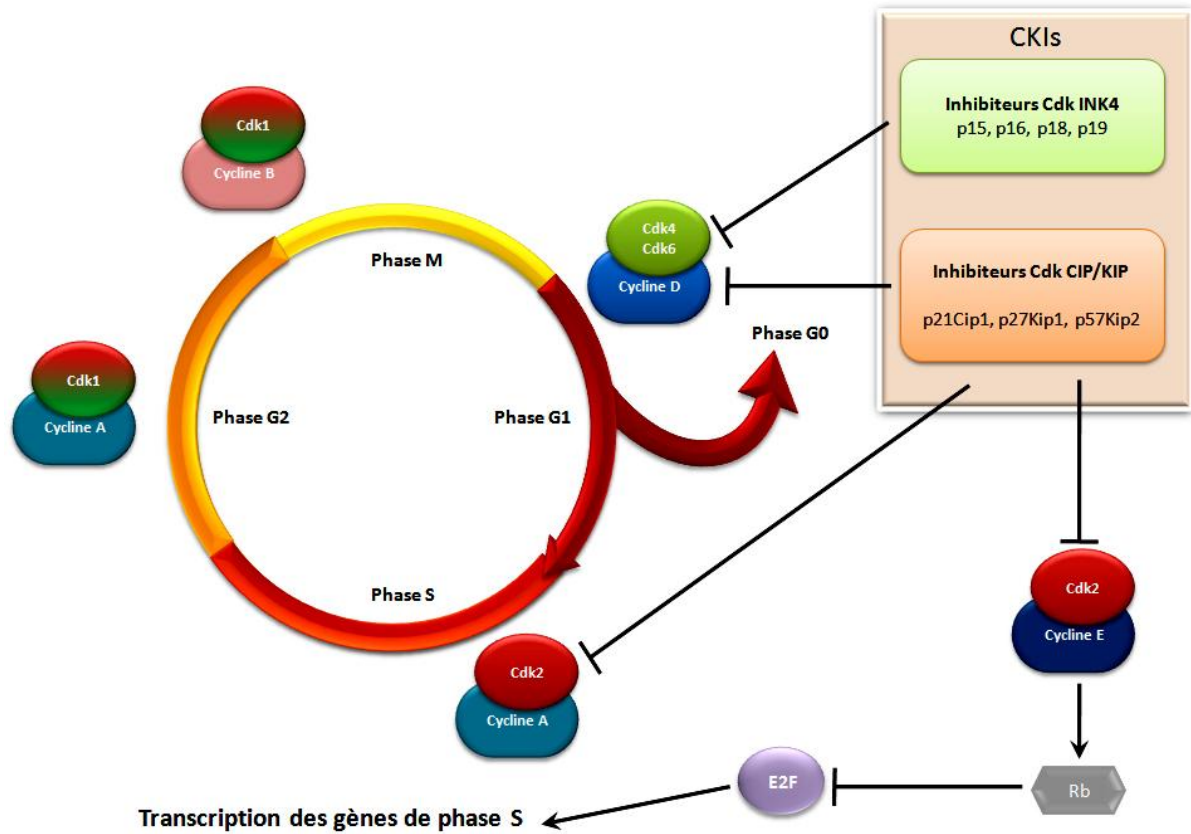


Figure 5| Schéma représentatif des principaux régulateurs impliqués dans la sortie du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire comprend 4 phases (G1, S, G2 et M) et la progression des cellules dans le cycle cellulaire est contrôlée par l'activation séquentielle des Cdk (kinases-cycline dépendantes) telles que Cdk4/6, Cdk1, Cdk2. L'activité de ces Cdk est contrôlée par différents mécanismes comme la synthèse et la fixation spécifique de sous-unités activatrices (Cyclines) ou inhibitrices de l'activité kinase (CKIs).

Les facteurs de croissance mitogènes exercent leur action en favorisant la synthèse des cyclines de type D et également l'assemblage des complexes Cdk4/6-Cyclines D actif. A l'opposé, l'expression de la Cycline E induite par une voie de signalisation intrinsèque et l'assemblage du complexe Cdk2-Cycline E se produit au point de restriction R afin de permettre la transition G1-S. La sortie de cycle s'effectue au niveau de la phase G1, par inactivation du complexe Cdk4/6-Cyclines D et inhibition de la formation des complexes Cdk2-Cycline E et Cdk2-Cycline A par les CKIs.

D'autre part, il existe des protéines qui contrôlent la formation des complexes entre Cyclines/Cdks (liaison entre les Cyclines et les Cdks) ou encore d'autres protéines qui contrôlent l'activité kinase des complexes Cyclines/Cdk par phosphorylation/déphosphorylation ou encore par fixation de protéines inhibitrices. Enfin, les protéines inhibitrices de l'activité des complexes Cyclines/Cdks sont appelées CKIs (Cdk inhibitors) (Pour revue ; Vidal et Koff, 2000).

La sortie de cycle implique une inhibition de l'activité des complexes Cyclines D/Cdk4 et Cyclines D/Cdk6. Ainsi, la formation et l'activation de ces complexes est régulée à différents niveaux. La régulation des Cyclines D et des Cdk4-6 peut s'exercer au niveau transcriptionnel et post-traductionnel. D'autre part, il existe 3 types de Cycline D (D1, D2 et D3) qui sont toutes les 3 impliquées dans la transition G1/S (Matsushime *et coll.*, 1994 ; Sicinski *et coll.*, 1995 ; Bouchard *et coll.*, 1999 ; Lukas *et coll.*, 1996 ; Carthon *et coll.*, 2005).

Au cours du développement du SNC, les Cyclines D1, D2 et D3 présentent des patrons d'expression distincts mais complémentaires (Wianny *et coll.*, 1998 ; Huard *et coll.*, 1999). Ceci suggère que les 3 types de Cycline D auraient d'autres fonctions, en dehors du contrôle du cycle. Par ailleurs, l'expression respective des 3 types de Cycline D est contrôlée par des signaux mitogènes extracellulaires différents tels que les facteurs de croissances (FGFs et Sonic Hedgehog). Ces données suggèrent que les différents types de Cycline D auraient des fonctions distinctes dans le contrôle de la différenciation de types neuronaux spécifiques (Pour revue ; Ohnuma *et coll.*, 2001 ; Ohnuma et Harris, 2003 ; Cremisi *et coll.*, 2003 ; Lobjois *et coll.*, 2004).

#### **2.2.1.4. Les CKIs et la sortie du cycle cellulaire.**

Il existe deux familles de CKIs, la famille INK4 et la famille CIP/KIP. Les CKIs ont pour principale fonction, de réguler les complexes D/Cdk4-6 et Cyclines E/Cdk2, à différents niveaux (Figure 5). En effet, les membres de la famille INK4 (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> et p19<sup>INK4d</sup>) interfèrent au niveau de l'interaction entre les Cyclines D et les Cdk4-6. En effet, les INK4 entrent en compétition avec les Cyclines D et se fixent de manière spécifique sur les protéines Cdk4 et Cdk6 et inhibent la formation de complexes Cyclines D/Cdk4-6. Contrairement aux INK4, les membres de la famille CIP/KIP (p21<sup>Cip1</sup>,



p27<sup>Kip1</sup> et p57<sup>Kip2</sup>) se fixent sur les complexes Cyclines D/Cdk4-6 et Cycline E/Cdk2 et inhibent l'activité kinase de ces complexes (Cheng *et coll.*, 1999 ; Gomez Lahoz *et coll.*, 1999 ; Coqueret, 2003).

Au cours du développement du SNC, l'induction de l'expression des CKIs au début de la phase G1 inhibe la progression du cycle cellulaire et favorise la sortie de cycle (Levine *et coll.*, 2000 ; Dyer et Cepko, 2001a, 2001b ; Gui *et coll.*, 2007 ; Herrup et Yang, 2007). Par exemple, l'expression de p27<sup>Kip1</sup> dans les progéniteurs neuronaux entraîne la sortie de cycle et favorise également la différenciation neuronale (Dyer et Cepko, 2001 ; Nguyen *et coll.*, 2006 ; Herrup et Yang, 2007). Ainsi, un des rôles des CKIs au cours de la neurogenèse est de contrôler la prolifération de progéniteurs neuronaux et d'induire la sortie de cycle des progéniteurs neuronaux. Toutefois, des données récentes ont montré que certains CKIs peuvent avoir des fonctions autres que régulateurs du cycle, au cours de la neurogenèse (Pour revue ; Nguyen *et coll.*, 2006). Par exemple, p27<sup>Kip1</sup> est également impliqué dans la migration des neurones dans le cortex cérébral chez la souris, par inhibition de la signalisation RhoA (Besson *et coll.*, 2004 ; Nguyen *et coll.*, 2006). De même, p21<sup>Cip1</sup> est exprimée dans une population neuronale restreinte (précurseurs des interneurons V2) ce qui suggère que p21<sup>Cip1</sup> aurait aussi d'autres fonctions que régulateur du cycle (Gui *et coll.*, 2007).

Enfin, en plus de ces mécanismes généraux, il en existe d'autres qui participent au contrôle de la prolifération cellulaire et de la sortie de cycle des progéniteurs neuronaux. Ces mécanismes impliquent des interactions intercellulaires (ou cellule-cellule) comme par exemple l'inhibition de contact entre cellules ou encore la voie de signalisation Notch.

### **2.2.2. La voie Notch.**

L'équilibre entre prolifération des progéniteurs neuronaux et sortie de cycle /différenciation est nécessaire durant toute la durée de la neurogenèse. Ainsi, cet équilibre implique les mécanismes de l'inhibition latérale et de la division asymétrique qui empêchent que toutes les cellules neurales ne se différencient précocement. Cet équilibre permet d'éviter la déplétion complète du réservoir de progéniteurs et un excès de différenciation de ces progéniteurs.

Durant le développement embryonnaire du tube neural, le nombre de progéniteurs neuraux tout comme leur position dans le tube neural et également la chronologie de leur sélection et engagement vers la différenciation sont bien définis. Cette détermination est dépendante de l'expression régionalisée de « gènes proneuraux » qui induisent la différenciation neuronale d'une part, et de signaux intercellulaires, inhibiteurs de la différenciation neuronale d'autre part.

En effet, dans un premier temps, les progéniteurs neuraux du neuroépithélium (stade plaque neurale) prolifèrent en se divisant de manière symétrique, c'est-à-dire que toutes les cellules filles seront identiques aux cellules mères. Plus tardivement, dans le tube neural, les progéniteurs neuraux peuvent se diviser de manière asymétrique, en générant des cellules qui auront des destins différents. En effet, la division asymétrique des cellules neurales génère d'une part, des cellules filles indifférenciées qui continuent de proliférer (comme la cellule mère). D'autre part, elles génèrent des cellules filles qui sortent du cycle pour se différencier en cellules neuronales ou en cellules gliales.

La décision des cellules neuroépithéliales de rester dans le cycle cellulaire ou de le quitter afin de s'engager vers une voie de différenciation, repose principalement sur un processus de signalisation entre cellules adjacentes, médié par le récepteur Notch. La voie Notch est un système de signalisation qui est impliqué dans la régulation de multiples processus de différenciation dans différents organes, au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte, tels que l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la somitogenèse, la vasculogenèse, la neurogenèse, la gliogenèse...

En effet, la voie Notch est un système de signalisation très conservée au cours de l'évolution et que l'on retrouve chez la plupart des organismes multicellulaires. Elle intervient dans le choix de la destinée cellulaire par 2 types de mécanismes, l'inhibition latérale (interactions cellule-cellule) et de la division asymétrique.

#### ***2.2.2.1. Le mécanisme d'inhibition latérale.***

L'inhibition latérale est basée sur des interactions entre récepteur Notch et ligands de Notch (Delta/Serrate), localisés à la surface membranaire des cellules. La voie de signalisation Notch est constituée du couple récepteur-ligand (Notch-Delta/Serrate) et des effecteurs de cette voie, de type Hes (Hairy et enhancer of split).

Le gène Notch qui code pour un récepteur transmembranaire, a été initialement découvert chez une souche de mouche présentant des défauts dans la structure des ailes (*Drosophila melanogaster*) en 1917. Des analyses génétiques et moléculaires ont permis d'identifier les composants de la voie Notch (*Notch*, *Delta*, *Serrate*, *Numb*, *Frindge*, *neuralized*, *Hairy* et *enhancer of split*, *bigbrain*, *mastermind*, *mindbomb*, *minibrain*, *Notchless...*) comme des gènes neurogéniques chez la drosophile (Wharton *et coll.*, 1985 ; Kidd *et coll.*, 1986 ; Thomas *et coll.*, 1991 ; Gu *et coll.*, 1995 ; Pour revue Portin, 2002).

L'inhibition latérale est un mécanisme en « feedback » ou rétrocontrôle qui permet, à partir d'une population cellulaire initialement homogène, de produire deux populations différentes (Figure 6). Le mécanisme d'activation de la voie Notch est connu et implique des interactions entre le récepteur Notch et un des ligands de ce récepteur exprimé par les cellules voisines. Chez les mammifères, 4 récepteurs Notch (Notch1, Notch2, Notch3 et Notch4) ont été identifiés, ainsi que 5 ligands, de type delta-like (Delta1, Delta3 et Delta4) et de type serrate-like (Jagged1 et Jagged2).

Dans la zone ventriculaire du tube neural, les progéniteurs neuraux expriment le récepteur Notch1 et un des 5 ligands de la voie Notch. L'interaction entre le récepteur Notch et un ligand de la famille Delta ou Jagged, entre cellules voisines, déclenche une cascade d'évènements dans chacune de ces cellules.

En effet, l'activation de Notch entraîne le clivage protéolytique du domaine C-Terminal intracellulaire du récepteur (NICD, pour Notch intracellular domain) par la préséniline de type 1 ( $\gamma$ -secrétase) et sa translocation dans le noyau de la cellule (De Strooper *et coll.*, 1999 ; Struhl et Greenwald, 1999) (Figure 7). Lorsque le fragment NICD est transloqué dans le noyau de la cellule, il s'associe au facteur de transcription CSL/RBP-J $\kappa$  (C promotor binding factor Suppressor of hairless/Lag1 / Recombining binding protein suppressor of hairless). Le complexe NICD-RBP-J $\kappa$  ainsi formé dans le noyau de la cellule, se fixe sur des séquences consensus de l'ADN (consensus GTGGGAA) et active l'expression des gènes effecteurs de la voie Notch tels que les gènes de la famille HES (*Hairy enhancer of split*) et de la famille HERP (*HES-related repressor protein*).

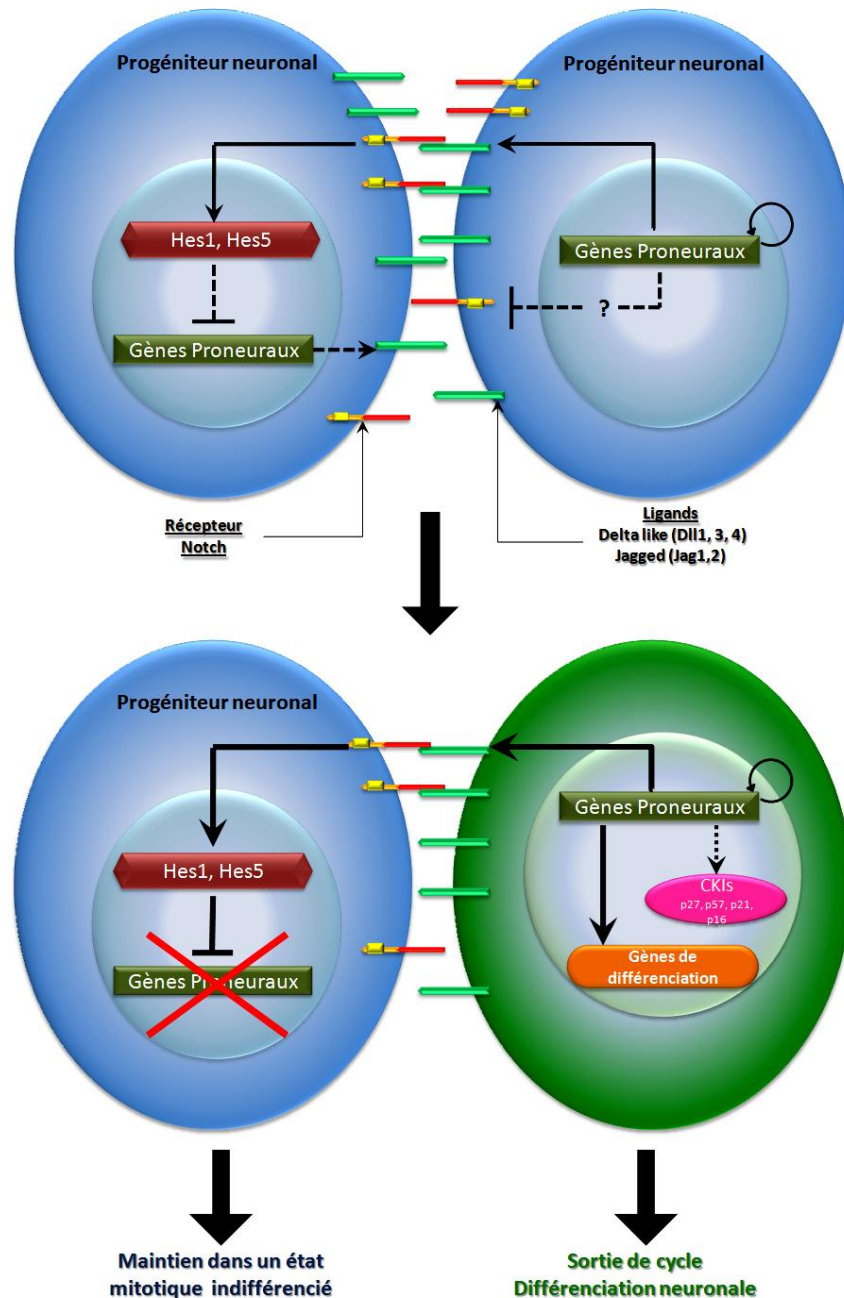


Figure 6| La voie Notch maintient l'équilibre entre prolifération et différenciation neuronale par le mécanisme d'inhibition latérale.

Durant la neurogenèse, les cellules du neuroépithélium expriment le récepteur Notch et un de ses ligands (Delta ou Jagged) à des niveaux identiques. Par le mécanisme de l'inhibition latérale, une boucle de régulation se met en place entre les cellules voisines et provoque une augmentation de l'expression de Delta/Jagged par les gènes proneuraux et également une répression de l'expression des gènes proneuraux par l'activation de la voie Notch. En conséquence, une légère augmentation de l'activité des gènes proneuraux dans une cellule entraîne la répression de l'expression des gènes proneuraux dans les cellules.

L'expression élevée des gènes proneuraux dans la cellule où elle est initiée, induit un programme génétique conduisant la cellule vers sortie de cycle et la différenciation neuronale. En effet, les gènes proneuraux induisent l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la sortie de cycle (par exemple les CKIs) et la différenciation neuronale. Dans la cellule voisine, l'activation de la voie Notch induit la répression de l'activité proneurale et inhibe la différenciation neuronale.

Les gènes de la famille HES codent des facteurs de transcription à domaine basique hélice boucle hélice ou bHLH (Basic helix loop helix) de type C. Les protéines à domaine bHLH peuvent se fixer sur l'ADN par l'intermédiaire de leur domaine basique. De plus, les facteurs de transcription à bHLH de type C sont capables de se fixer à l'ADN, de manière spécifique sur des séquences consensus à « boîte N » ou « N-box » (séquence consensus de type CACNAG) et ont comme propriété d'être des répresseurs transcriptionnels (Pour revue ; Iso *et coll.*, 2003).

L'activation de Notch induit l'expression de HES1 et HES5 (Pour revue ; Kageyama et Ohtsuka, 1999 ; Kageyama *et coll.*, 2005). Ces effecteurs de la voie Notch ont pour principale fonction de réprimer l'expression des gènes proneuraux. Cette répression s'effectue soit par un mode de « répression active » soit par « répression directe ». Dans le cas de la « répression active », HES1 et HES5 sont capables de se dimériser afin de se fixer sur la « boîte N » des promoteurs des gènes proneuraux et de réprimer l'expression des gènes proneuraux par l'intermédiaire du corépresseur Groucho. Enfin, l'autre mécanisme de répression est lié à la possibilité pour HES1 et HES5 de former des hétérodimères dominants-négatifs qui vont se fixer sur la « boîte N » et la « boîte E » (séquence consensus de type CANNTG) des promoteurs des gènes proneuraux afin d'inhiber leur expression (Pour revue ; Kageyama et Ohtsuka, 1999) (Figure 8).

Alors que dans le tube neural, l'activation de Notch induit l'expression de HES1 et HES5 (2 effecteurs inhibiteur de la neurogenèse), HES6 participe à la différenciation neuronale par divers mécanismes et notamment en réprimant l'expression de HES1 (Koyano-Nakagawa *et coll.*, 2000 ; Gratton *et coll.*, 2003 ; Fior et Henrique, 2005 ; Jhas *et coll.*, 2006).

La répression de l'expression des gènes proneuraux inhibe la neurogenèse et permet de maintenir les cellules neurales dans un état mitotique indifférencié. A l'inverse, dans les cellules voisines où le récepteur Notch n'est pas activé, les gènes proneuraux répriment indirectement l'expression de Notch, et induisent l'arrêt de la prolifération et la sortie du cycle de la cellule neurale afin que cette dernière s'engage dans une voie de différenciation neuronale (Artavanis-Tsakonas *et coll.*, 1999).

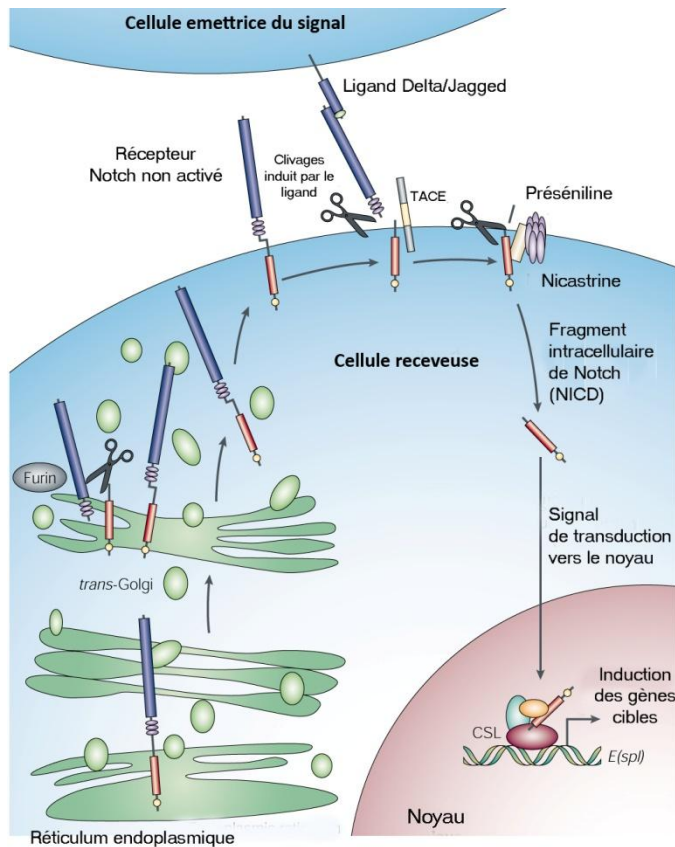


Figure 7| **Mécanisme d'activation de la voie Notch.**

(D'après Fortini, 2002)

Le récepteur Notch est synthétisé sous forme d'un précurseur qui subira de nombreux clivages protéolytiques post-traductionnels avant d'être transporté vers la surface de la cellule, comme récepteur fonctionnel.

La fixation des ligands de la famille Delta, Jagged sur le récepteur Notch provoque le clivage du domaine extracellulaire de Notch par le complexe TACE/ADAM. Le domaine C-terminal intracellulaire de Notch sera également clivé de manière séquentielle par le complexe  $\gamma$ -secrétase qui contient, entre autre, la préséniline-1, la nicastrine. Ce clivage protéolytique entraîne la translocation du domaine intracellulaire de Notch (NICD) vers le noyau où il va contrôler l'expression de gènes cibles tels que les gènes *Enhancer of split* (gènes de la famille Hes, Herp), en association avec d'autres facteurs nucléaires tels que CSL (C promotor binding factor/suppressor of hairless/Lag1).

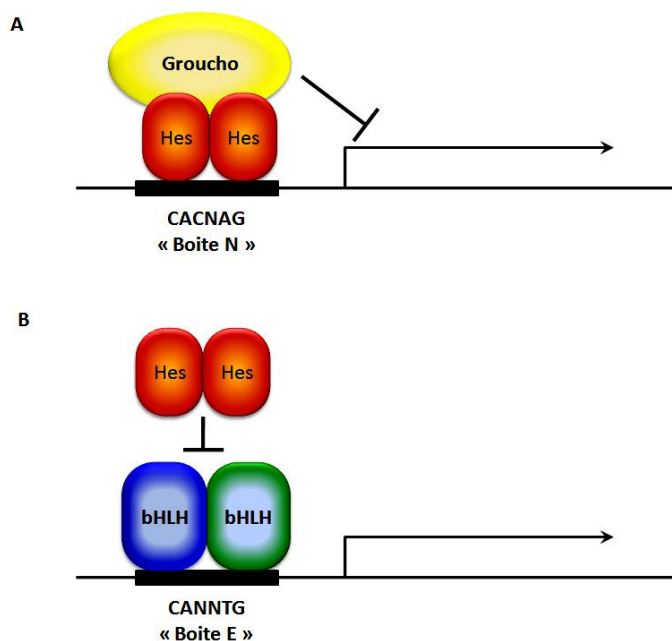


Figure 8| **Mécanismes de répression transcriptionnelle par les Hes.**

(Adapté d'après Kageyama et Ohtsuka, 1999)

(A) Exemple de répression active. Les Hes peuvent former des dimères et se fixer à la « boîte N ». Le corépresseur Groucho interagit avec le domaine C-terminal WRPW et assure la répression de manière active.

(B) Exemple d'effet dominant négatif. La plupart des facteurs de transcription à domaine bHLH se fixent sur la « boîte E » et activent l'expression des gènes cibles. Des études ont montré que Hes1 peut avoir un effet « dominant négatif » sur les bHLH activateurs en formant des complexes hétérodimériques non fonctionnels.

### 2.2.2.2. *La division asymétrique.*

Un autre mécanisme est impliqué dans le contrôle du devenir des progéniteurs, la division asymétrique. La division asymétrique est un mécanisme conservé, basé sur le partage de déterminants cellulaires et d'informations entre les cellules filles durant la mitose. La division asymétrique participe largement à la diversification des destins cellulaires au cours du développement, la cellule-mère se divisant en deux cellules-filles ayant chacune un destin différent. Ce mécanisme a d'abord été décrit chez des invertébrés tels que la drosophile et le nématode.

En effet, au cours de la neurogenèse embryonnaire chez la drosophile, la division asymétrique constitue le mécanisme primaire à la base de la génération de la diversité du devenir des cellules. Par exemple, dans le SNC de drosophile, les neuroblastes se divisent asymétriquement, pour produire des neuroblastes d'une part et des cellules précurseurs appelées GMC (Ganglion mother cell) qui vont à leur tour se diviser de manière asymétrique et générer des neurones et des cellules gliales (Campos-Ortega, 1993 ; Doe et Technau, 1993).

Chez la drosophile et le *Caenorhabditis elegans*, où le mécanisme a été particulièrement bien étudié, la division asymétrique est étroitement liée à l'établissement de la polarité cellulaire (apico-basal). Dans les neuroblastes, plusieurs protéines et ARNm qui sont des déterminants du devenir cellulaire, présentent une localisation basale. Ces déterminants seront ségrégués exclusivement dans les GMC lors de la cytokinèse. Ce processus est également observé au cours de la division asymétrique des neuroblastes et des cellules précurseurs des organes sensoriels (SOP) du système nerveux périphérique (SNP) de la drosophile. Des régulateurs clés ont été identifiés : Numb, Prospéro (Pros), Neuralized et un groupe de protéines formant le complexe PAR/aPKC. Numb, un déterminant du destin cellulaire, inhibe la voie Notch, en interagissant avec Sanpodo, qui entraîne l'internalisation de Notch (Pour revue ; Justice et Jan, 2002). Numb est localisée au pôle basal de la cellule, avec d'autres déterminants comme Prospéro, l'ARNm de Prospéro, grâce à leurs adaptateurs protéiques respectifs, Pon (Partner of Numb), Miranda et Straufen (Wodarz et Huttner, 2003). Lors de la division asymétrique, l'une des cellules-filles hérite de déterminants tels que Numb, et aura un destin différent de l'autre cellule-fille. Les études biochimiques ont établi que le

complexe PAR/aPKC, composé de protéines régulatrices du cytosquelette joue un rôle important dans l'établissement de la polarité cellulaire et la localisation des déterminants. L'association du complexe PAR/aPKC aux protéines Inscuteable, Pins (Partner of inscuteable) et Gai (complexe protéines G hétérotrimériques) au pôle apical de la cellule coordonne l'orientation de l'axe de division et la répartition des déterminants de manière asymétrique (Pour revue ; Roegiers et Jan, 2004).

Les mécanismes moléculaires assurant de la division asymétrique chez les vertébrés restent mal connus (Pour revue ; Huttner et Kosodo, 2005). Toutefois, des études en imagerie cellulaire réalisées en particulier chez les mammifères, ont révélé l'existence de similitudes et de différences par rapport à la drosophile et à *Caenorhabditis elegans*. En effet, au cours de la neurogenèse chez les vertébrés, les progéniteurs du neuroépithélium présentent une polarité (apico-basale) et également une répartition asymétrique de certains déterminants comme Numb.

### **2.2.3. Rôle des facteurs de transcription à domaine bHLH au cours de la neurogenèse.**

#### ***2.2.3.1. Définition des facteurs de transcription à domaine bHLH.***

Les facteurs de transcription à domaine bHLH constituent une superfamille de régulateurs transcriptionnels, impliqués dans le contrôle de multiples processus développementaux tels que, la neurogenèse, la myogenèse, la détermination de lignages cellulaires, la prolifération et la différenciation cellulaire (Murre *et coll.*, 1989a,b ; Sun et Baltimore, 1991 ; Murre *et coll.*, 1994). Ces facteurs de transcription sont très conservés au cours de l'évolution et on les retrouve chez de nombreux organismes, de la levure aux mammifères. Ils sont caractérisés par un motif conservé de type basique hélice boucle hélice, appelé bHLH (basic helix loop helix). Le motif bHLH est commun à tous les facteurs de transcription à bHLH et leur confèrent plusieurs propriétés qui ont fait l'objet de nombreuses études biochimiques (Murre *et coll.*, 1989a,b ; Voronova et Baltimore, 1990).



### **2.2.3.2. Propriétés et classification des facteurs de transcription à domaine bHLH.**

Le motif bHLH est caractérisé par un domaine basique de liaison à l'ADN et un domaine d'interaction protéine-protéine très conservé (Murre *et coll.*, 1989a,b). Le domaine basique permet à ces facteurs de transcription, de se fixer sur une séquence consensus de l'ADN appelée « boîte E » ou « E-box » (CANNNTG) (Voronova et Baltimore, 1990). Le domaine hélice-boucle-hélice est constitué d'acides aminés hydrophobes qui permettent des interactions protéine-protéine, pour former des hétérodimères et ou des homodimères (Murre *et coll.*, 1989b). D'autre part, plusieurs facteurs de transcription à domaine bHLH possèdent également un motif « glissière à leucine » ou « leucine zipper » (LZ), proche du motif bHLH, en position carboxy-terminale (C-terminale).

Le motif bHLH a d'abord été identifié chez les facteurs de transcription E12 et E47 par l'équipe de Murre et collaborateur en 1989. Depuis, un grand nombre de facteurs de transcription à domaine bHLH ont été identifiés. La classification de ces facteurs de transcription est basée sur la similarité des séquences bHLH, en utilisant l'algorithme Clustal W. (Thompson, *et coll.*, 1994 ; Atchley et Fitch, 1995). De nombreuses familles de facteurs de transcription ont été identifiées et regroupées en fonction de leurs caractéristiques phylogénétiques et notamment sur leur profil de fixation à la « boîte E » (Murr *et coll.*, 1989b ; Hu *et coll.*, 1990 ; Dang *et coll.*, 1992 ; Swanson *et coll.*, 1995). Ainsi, les différentes familles de facteurs de transcription à domaine bHLH ont été rangées dans 4 groupes (A, B, C et D) (Lee, 1997 ; Atchley et Fitch, 1997 ; Hassan et Bellen, 2000).

### **2.2.3.3. Mise en évidence des gènes proneuraux et définition de la fonction proneurale.**

Durant la mise en place du SNC, les multiples types de cellules neuronales et gliales doivent être générés en nombre suffisant, à des positions bien définies et dans une chronologie précise. Des études génétiques réalisées à la fois chez la drosophile et chez les vertébrés ont mis en évidence le rôle clé des gènes proneuraux au cours de la

neurogenèse. La fonction proneurale a été définie comme étant la capacité d'un gène à induire la différenciation neuronale (Figure 9). Les gènes proneuraux jouent en effet un rôle crucial dans les mécanismes permettant l'acquisition de l'identité neuronale (différenciation des progéniteurs neuraux en neurones).

La plupart des gènes de vertébrés apparentés aux gènes proneuraux de la drosophile sont exprimés principalement au cours du développement du système nerveux. Bien que les gènes proneuraux de la drosophile et des vertébrés présentent une bonne conservation des séquences, il existe des différences au niveau de la fonction proneurale chez la drosophile et chez les vertébrés. Chez la drosophile, l'activité proneurale permet de sélectionner les cellules de l'ectoderme (cellules épithéliales pluripotentes) qui vont devenir des progéniteurs neuraux capables de générer des cellules gliales et des cellules neuronales. Chez les vertébrés, les gènes proneuraux sont exprimés dans les cellules neuroépithéliales qui sont déjà prédéterminées pour un destin neural et l'activité proneurale permet d'engager les progéniteurs neuronaux vers la différenciation. Ainsi, l'activité proneurale permet l'induction de la différenciation neuronale de manière générique (c'est-à-dire l'induction de l'expression de marqueurs de différenciation neuronale tels que NeuN et  $\beta_{III}$ -tubuline).

#### **2.2.3.4. Identification des gènes proneuraux.**

Des études génétiques et moléculaires réalisées chez la drosophile ont permis d'isoler 4 gènes (*achaete*, *scute*, *lethal of scute* et *asens*) dont les produits forment le complexe *achaete-scute*. Ce complexe joue un rôle clé dans les étapes précoces du développement neural (Garcia-Bellido, 1979 ; Villares *et coll.*, 1987). Les produits de ces gènes ont la particularité de partager des séquences en acides aminés similaires et également un domaine à motif bHLH, support de leur fonction. Ces domaines sont capables d'interagir entre eux et d'entraîner la formation soit d'homodimères soit d'hétérodimères, pour pouvoir se fixer à l'ADN. Le gène *atonal* (*ato*) a été isolé chez la drosophile, par homologie de séquence du domaine bHLH des gènes du complexe *achaete-scute* (*asc*). D'autres gènes codant des protéines à domaine bHLH, exprimées durant la neurogenèse ont été isolés et classés dans les 2 familles de gènes proneuraux, *asc* et *ato*. De plus, des analyses effectuées chez la drosophile dans un contexte de perte

ou de gain de fonction, ont démontré que les protéines des familles *asc* et *ato* sont nécessaires et suffisantes pour induire la différenciation des progéniteurs neurectodermiques en neurones (Jimenez *et coll.*, 1993 ; Jan *et coll.*, 1994).

Sur la base de la conservation du motif bHLH des familles *asc* et *ato*, des gènes homologues aux gènes proneuraux de drosophile ont été identifiés chez les vertébrés. D'autres gènes codant des protéines à domaine bHLH impliquées dans la neurogenèse ont également été identifiés et caractérisés par leur capacité à se dimériser avec les autres protéines à bHLH par l'intermédiaire de la technique des doubles-hybrides chez la levure. Les gènes de vertébrés codant pour des facteurs de transcription à domaine bHLH présentant des similitudes par rapport aux gènes proneuraux des complexes *asc* et *ato* de drosophile sont nombreux, mais il existe peu d'orthologues parmi eux (Lee, 1997 ; Guillemot, 1999).

#### ***2.2.3.5. Classification et fonctions générales des facteurs de transcription à bHLH, durant le développement du SNC.***

Les nombreux gènes codant pour des protéines à domaine bHLH, sont subdivisés en 2 types, suivant leur activité transcriptionnelle : répresseurs (tels que les gènes de la famille Hes) et activateurs (comme Mash1, Math et Neurogénines). Parmi les gènes codant pour des facteurs de transcription à domaine bHLH, on distingue 8 grandes familles dont les produits sont impliqués dans la mise en place du système nerveux : les familles Achaete-Scute, Neurogénines, NeuroD, Olig, Nato, atonal, protéines E et Nscl (Figure 10).

D'autre part, une famille de gènes codant pour des protéines à domaine HLH, la famille Id, a été mise en évidence, au cours de la neurogenèse. Les protéines Id sont des régulateurs négatifs de l'activité des protéines à domaine bHLH (Ross *et coll.*, 2003). Ils sont des régulateurs de la neurogenèse et participent au maintien du pool de progéniteurs (Tzeng, 2003 ; Andres-Barquin *et coll.*, 2000).

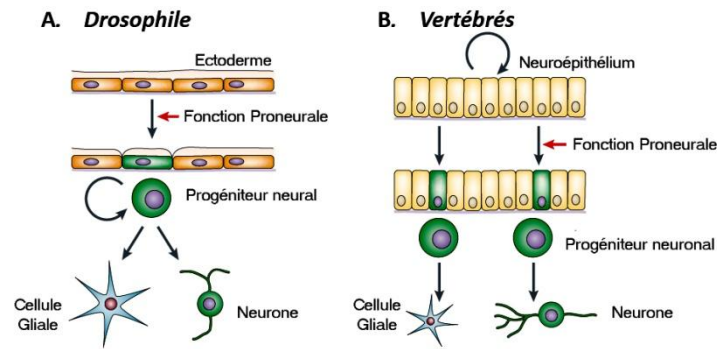


Figure 9| **La fonction proneurale similaire chez les invertébrés et les vertébrés ?**  
(Adapté d'après Bertrand *et coll.*, 2002)

Les gènes proneuraux sont nécessaires pour la sélection des progéniteurs et pour leur engagement dans un programme de différenciation spécifique, et ce processus de sélection est médiée en partie par l'activation de la voie Notch. Chez la drosophile (A), les gènes proneuraux sont d'abord exprimés dans les cellules ectodermiques quiescentes qui ont la capacité de donner des dérivés ectodermiques et neuronaux. L'activité proneurale se résume dans la sélection des progéniteurs qui vont s'engager vers un destin neuronal mais demeurent multipotentes car ils génèrent les progéniteurs des organes sensoriels, les neurones, les cellules gliales et les autres types non neuronaux du système nerveux. Chez les vertébrés (B), les gènes proneuraux sont exprimés dans les progéniteurs du neuroépithélium au destin neural déjà établi et qui ont la capacité d'autorenouvellement. L'activité proneurale induit la génération et la délaminéation des progéniteurs qui seront restreints à un destin neuronal ou glial et ont un potentiel mitotique limité.

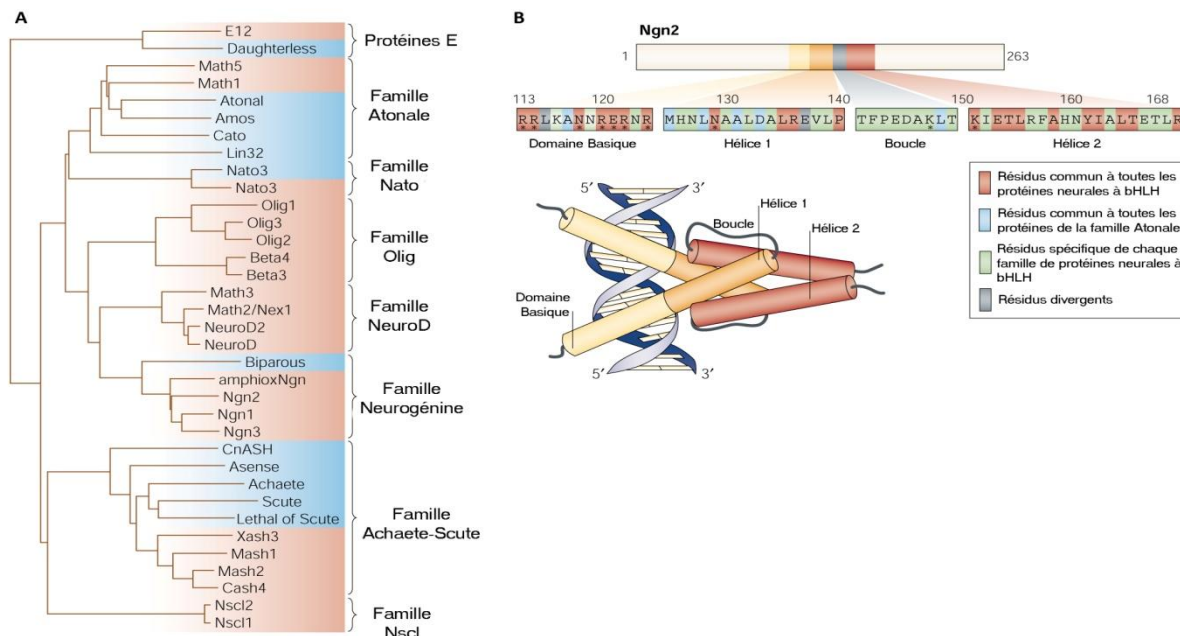


Figure 10| **Structure et propriétés des protéines neurales à bHLH.**  
(Adapté d'après Bertrand *et coll.*, 2002)

(A) Dendrogramme de la séquence du domaine bHLH (domaine basique hélice boucle hélice) d'invertébrés (bleu) et de vertébrés (rouge) des protéines neurales à bHLH. Ces protéines ont été classées dans des familles distinctes, en se basant sur la conservation des séquences dans le domaine bHLH.

(B) Séquence du domaine bHLH de la protéine proneurale neurogénine 2 (Ngn2) de souris. Le code de couleur indique le degré de conservation des 4 parties du domaine bHLH entre chaque protéine neurale à domaine bHLH. L'astérisque indique que l'acide aminé concerné peu se fixer à l'ADN, en se basant sur la structure cristallographique des autres protéines à domaine bHLH. Enfin, la représentation schématique de la structure dimérique bHLH qui est constituée à l'ADN. Le domaine basique constitue la principale zone de liaison à l'ADN et ce domaine se fixe directement sur la séquence à « boîte E ». Les 2 hélices  $\alpha$  interagissent avec d'autres hélices  $\alpha$  de protéines à bHLH afin de former un dimère.

La plupart des facteurs de transcription à domaine bHLH sont des activateurs transcriptionnels. Ces facteurs de transcription impliqués dans la neurogenèse (Mash1, Math, Neurogénines, ...) forment des hétérodimères avec un autre facteur de transcription à domaine bHLH exprimé de manière ubiquitaire, E47. La fixation de ces hétérodimères sur la « boîte E » des régions régulatrices de gènes cibles, permet d'activer la transcription de ces derniers. Les gènes cibles des protéines proneurales à bHLH peuvent être des gènes liés à la promotion de la sortie de cycle ou des gènes associés à la différenciation neuronale tels que NeuroD.

Cependant, il existe des facteurs de transcription à domaine bHLH ayant une activité de répresseur de la transcription tel que Olig2 (gène structurellement apparenté au gène proneural atonal de la drosophile (Cabrera et Alonso, 1991 ; Johnson *et coll.*, 1992 ; Novitch *et coll.*, 2001 ; Mizuguchi *et coll.*, 2001 ; Kageyama *et coll.*, 2005).

#### ***2.2.3.6. Rôle des gènes proneuraux dans la sortie de cycle et la différenciation neuronale.***

Les gènes proneuraux sont impliqués dans le couplage entre la sortie de cycle et la différenciation des progéniteurs neuraux. Ils exercent un contrôle négatif sur le cycle cellulaire des progéniteurs neuronaux, en induisant l'expression de CKIs (inhibiteurs du cycle) tels que p16<sup>INK4</sup>, p21<sup>Cip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup> et p27<sup>Kip1</sup>. L'augmentation de l'expression des CKIs permet d'inhiber la transition de phase G1/S et induit la sortie de cycle (Edlund et Jessell, 1999 ; Farah *et coll.*, 2000 et Ohnuma *et coll.*, 2001) (Figure 5).

Chez les vertébrés, les gènes neuraux codant des protéines à domaine bHLH ont des fonctions divergentes. Les gènes des familles Achaete-Scute, Neurogénines et potentiellement des membres de la famille atonal ont une fonction assez proche, tandis que celle des autres familles de gènes codant des protéines neurales à bHLH présentent des différences. En effet, les gènes proneuraux Mash1, Neurogénines (Ngn1-3) et Math1 sont capables d'induire individuellement la différenciation neuronale. À l'opposé, les autres gènes codant des facteurs de transcription à domaine bHLH n'ont pas une fonction proneurale et ne sont donc pas suffisants pour induire la différenciation neuronale. Toutefois, ces gènes participent à la spécification des différents types

neuronaux. Par exemple, les membres de la famille NeuroD sont des gènes de différenciation (Farah *et coll.*, 2000).

### **2.2.3.7. Les autres fonctions des facteurs de transcription à bHLH au cours de la mise en place du SNC.**

Ainsi, certains gènes codant les facteurs de transcription à domaine bHLH participent à la spécification des différents types neuronaux. Par exemple, le gène proneural Mash1 est exprimé dans la partie ventrale du télencéphale et joue un rôle crucial dans la spécification des neurones GABAergiques. Dans la partie dorsale du télencéphale, Ngn2 est impliqué dans la spécification des neurones glutamatergiques (Fode *et coll.*, 2000 ; Parras *et coll.*, 2002). De plus, dans la partie dorsale du télencéphale, en absence de Ngn2, Mash1 est exprimé de manière ectopique et il est responsable de la spécification de neurones GABAergiques ectopiques. Ainsi, les gènes proneuraux tels Mash1 et Ngn2 sont capables de contrôler la spécification de différents types neuronaux. En effet, Mash1 est impliqué dans la spécification de multiples types neuronaux dans le SNC et le SNP. Il est important pour la spécification des neurones GABAergiques, comme dans le télencéphale et dans la moelle épinière, les neurones sérotoninergiques dans le cerveau postérieur et aussi les neurones catécholaminergiques du système sympathique (Fode *et coll.*, 2000 ; Parras *et coll.*, 2002 ; Goridis et Rohrer, 2002 ; Pattyn *et coll.*, 2004 ; Tsarovina *et coll.*, 2004). Ngn2 est aussi impliqué dans la spécification d'autres types de neurones, interneurons dorsaux et motoneurons dans la moelle épinière (Fode *et coll.*, 2000 ; Helms *et coll.*, 2005).

L'expression combinée de différents gènes codant des protéines à domaine bHLH, et d'autres gènes codant des protéines à homéodomaine, est importante pour la génération de divers types neuronaux. Par exemple, dans la rétine où les progéniteurs neuronaux donnent naissance à 6 types de neurones, Math3 et NeuroD sont nécessaires à la différenciation des cellules amacrines tandis que Mash1 ou Math3, associé à Chx10, induit l'expression de neurones bipolaires (Hatakeyama *et coll.*, 2001 ; Inoue *et coll.*, 2002).

Enfin, certains gènes proneuraux participent aux mécanismes de spécification et de différenciation des cellules gliales, comme par exemple, le gène Mash1. Des études de

lignage génétique chez la souris, ont révélé que, dans la moelle épinière d'embryons de souris, Mash1 est exprimé dans les progéniteurs neuronaux à E10.5 et dans les progéniteurs des oligodendrocytes OPCs à E16.5. Ainsi, Mash1 permet de spécifier les interneurones et secondairement, les oligodendrocytes (Battiste *et coll.*, 2007). Mash1 et un des deux gènes codant une protéine à domaine bHLH, Olig1 et Olig2, ont un rôle synergique dans la génération des OPCs (Gokhan *et coll.*, 2005 ; Parras *et coll.*, 2007). D'autres gènes sont également impliqués dans la spécification des cellules neuronales et gliales et notamment Olig2. En effet, dans la moelle épinière embryonnaire, Olig2 est d'abord nécessaire à la différenciation des motoneurones, puis plus tardivement, il joue un rôle clé dans la spécification et la différenciation des OPCs en oligodendrocytes (Pour revue ; Wegner, 2001 ; Park *et coll.*, 2002 ; Takebayashi *et coll.*, 2002 ; Pour revue ; Rowitch, 2004). Très récemment, une étude a établi que la combinaison de gènes codant les protéines à domaine bHLH (Mash1, Ngn1-3) avec d'autres gènes codant d'une part, pour des facteurs de transcription à homéodomaine (Pax6, Nkx2.2) et d'autre part pour des inhibiteurs de la neurogenèse (Id1-2, Hes1) est essentielle au développement des cellules gliales (Sugimori *et coll.*, 2007).

### **3. Polarisation du tube neural.**

Au cours du développement embryonnaire du SNC, la partie rostrale du tube neural se renfle pour former 3 vésicules (le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale) tandis que la partie caudale s'allonge. Suivant l'axe antéropostérieur, ces 3 vésicules se subdivisent pour former 5 vésicules : le télencéphale et le diencephale (dérivent du prosencéphale), le mésencéphale, le métencéphale et le myélocéphale. Au sein de chacune de ces régions, les mécanismes de régionalisation de l'axe DV établissent la diversité des types neuronaux.

Le choix du programme génétique de différenciation des différentes populations neuronales dans le tube neural dépend donc de la position des progéniteurs neuronaux suivant l'axe DV et l'axe AP. Les deux systèmes qui définissent les axes AP et DV sont activés simultanément durant les étapes de développement très précoces (dès le stade plaque neurale – gouttière neurale). Ces deux axes permettent d'établir un système de coordonnées spatiales pour le positionnement des progéniteurs neuronaux à l'intérieur du tube neural.

#### **3.1. Les mécanismes de mise en place de l'axe antéropostérieur du tube neural.**

Plusieurs classes de facteurs sécrétés sont impliquées dans la polarisation antéropostérieure du tube neural et notamment dans l'acquisition du caractère neural postérieur. Ces facteurs sont les FGFs (Fibroblast growth factors), l'acide rétinoïque (AR), les BMPs (Bone morphogenetic proteins), les WNTs (Wingless Integrated) et l'activité inductrice du mésoderme paraxial caudal (PMC). Ces signaux proviennent essentiellement de tissus non neuronaux (mésoderme paraxial caudal, endoderme) en contact avec le tissu neural (Doniach, 1995 ; Storey *et coll.*, 1998 ; Bang *et coll.*, 1999).

En effet, des expériences d'ablation et de greffe de PMC contre le tube neural, chez l'embryon de poulet ont montré que le PMC est nécessaire au maintien du programme génétique responsable du caractère caudal du tube neural.



Au cours de l'allongement du tube neural suivant l'axe AP et la maturation du tube neural, l'extinction de l'expression des gènes caudaux s'accompagne de l'activation d'autres gènes liés à la polarisation DV du tube neural (Bertrand *et coll.*, 2000 ; Diez del Corral *et coll.*, 2002 ; Diez del Corral *et coll.*, 2003).

### **3.1.1. Rôle de la signalisation FGF.**

Différentes expériences ont permis de proposer un modèle selon lequel l'exposition des cellules du tube neural aux FGFs, impose de manière générique, la caractéristique neurale caudale du tube en formation (Muhr *et coll.*, 1999). La transduction du signal FGF peut être médiée par 3 voies principales :

- ❖ La voie Ras/MAPK
- ❖ La voie de la PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup>
- ❖ La voie de la PI3K/AKT

La transduction du signal FGF par les voies Ras/MAPK et PI3K/AKT entraîne une cascade d'activation par phosphorylation, permettant l'activation de facteurs de transcription tels que c-Myc, AP1 et les membres de la famille Ets (Figure 11). La transduction du signal par la voie PLC $\gamma$ /Ca<sup>2+</sup> aboutit à l'activation de la PKC et la libération de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire notamment au cours des mécanismes de caudalisation du tube neural chez le xénope (Pour revue Brottcher et Niehrs, 2005).

La voie FGF joue un rôle majeur dans le maintien des caractéristiques caudales du tube neural, mais ce n'est pas le seul mécanisme puisque les somites (issus du mésoderme paraxial) sont aussi impliqués dans la maturation du tube neural (Diez del Corral *et coll.*, 2003). L'allongement progressif du tube neural dans l'axe AP est associé à la maturation progressive du tube neural, de la partie rostrale vers la partie caudale. Il y a la nécessité d'extinction progressive de la signalisation FGF le long de l'axe AP afin de permettre la maturation. Les somites produisent un facteur diffusible capable d'inhiber l'effet des FGFs et induire la maturation du tube neural. Ce facteur diffusible a été identifié comme étant l'acide rétinoïque (AR).

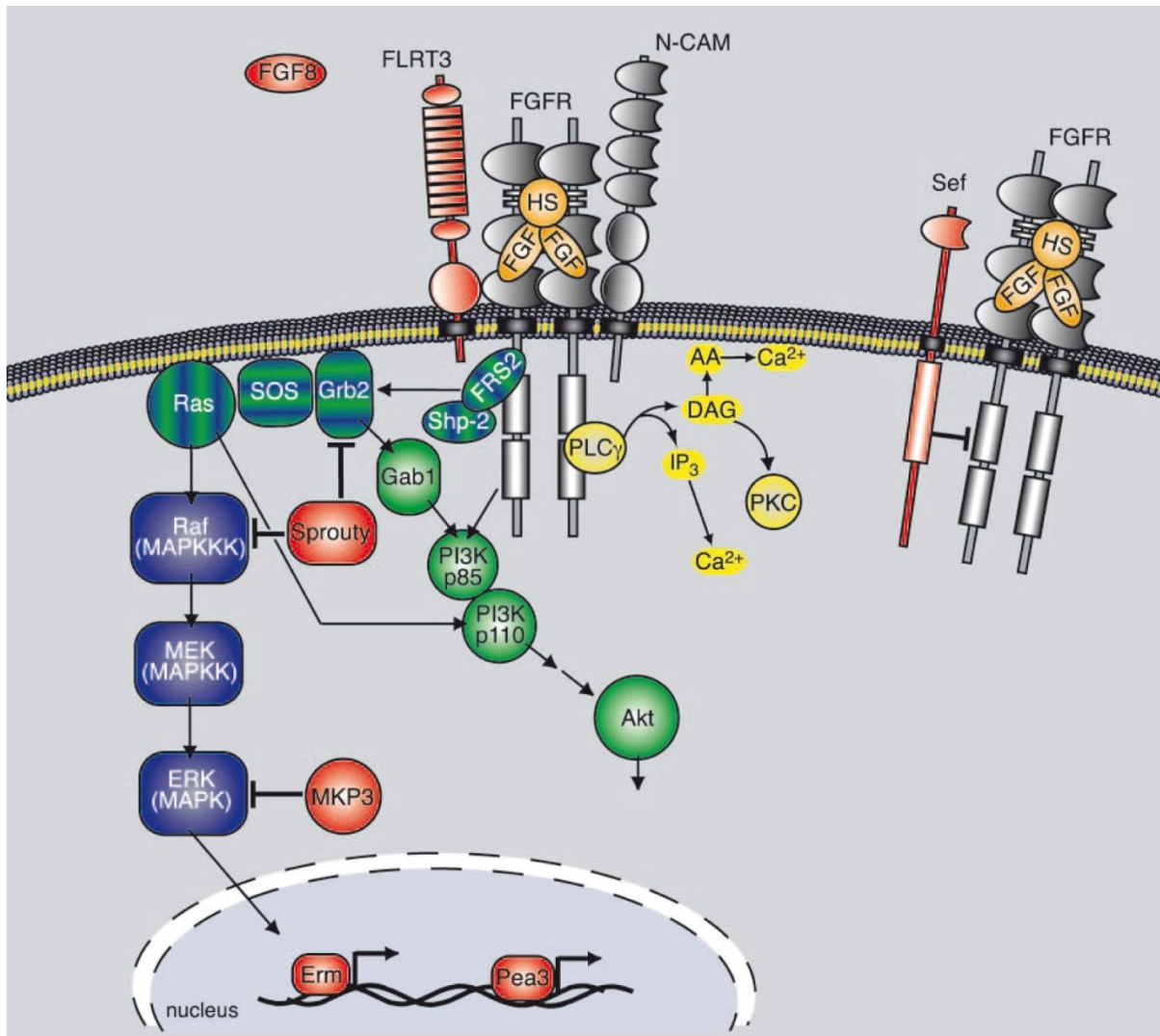


Figure 11| **Voie de signalisation intracellulaire des FGFs.**

(D'après Böttcher et Niehrs, 2005)

La formation du complexe ternaire FGF-héparine-FGFR (FGFR, est le récepteur au FGF), conduit à l'autophosphorylation et à l'activation de cascades de signalisation intracellulaires telle que la voie Ras/MAPK (en bleu), la voie AKT/PI3Kinase (en vert) et la voie PLC $\gamma$ /Ca $^{2+}$  (en jaune). Les protéines communes à deux voies de signalisation intracellulaires sont hachurées (rayures bleues et vertes). Les membres du groupe de synexpression de FGF sont illustrés en rouge.

La cascade Ras/MAPK est activée par la fixation de Grb2 qui phosphoryle FRS2. La conséquence de la formation du complexe Grb2/SOS induit en cascade l'activation de Ras et celle des Kinases.

Les 3 routes par lesquelles les récepteurs FGFRs peuvent activer la voie AKT/PI3 kinase sont indiquées. Premièrement, Gab1 peut se fixer à FRS2 indirectement, par l'intermédiaire de Grb2. Il en résulte la phosphorylation de la tyrosine et l'activation de la voie AKT/PI3 Kinase par l'intermédiaire de p85. Deuxièmement, p85 (sous-unité régulatrice de PI3 Kinase) peut se fixer au FGFR et phosphoryler le résidu tyrosine. De manière alternative, l'activation de Ras peut induire la localisation et l'activation de la sous-unité catalytique p110 de la PI3-kinase.

AA : Acide Arachidonique ; DAG : diacylglycérol ; PI $_3$  : inositol-1,4,5-triphosphate.

### **3.1.2. Rôle de la signalisation Acide Rétinoïque dans le patron d'expression**

#### **AP.**

L'AR est impliqué dans de nombreux processus développementaux. Au cours du développement embryonnaire du SNC, il joue un rôle important dans l'établissement du patron d'expression suivant les axes antéropostérieur et dorsoventral. Il est synthétisé dans les somites à partir de la vitamine A, par une enzyme clé, la rétinaldéhyde deshydrogénase-2 (RALDH-2). Ainsi, l'AR produit par les somites va diffuser vers le tube neural. Dans les cellules neurales, il se fixe sur un transporteur cytoplasmique CRABP (cytoplasmic retinoic acid binding protein) puis entre dans le noyau où il se fixera à des récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR et RXR). Les complexes AR-RAR/RXR s'hétérodimérisent afin de se fixer sur des séquences spécifiques de l'ADN, la séquence RARE (Retinoic acid responsive element), localisées sur les gènes cibles, afin d'en activer la transcription (Maden, 2000). Chez les vertébrés, plusieurs gènes proneuraux et neurogéniques sont contrôlés par l'AR. Des études effectuées chez le xénope ont montré que l'AR est impliqué dans l'induction de l'expression de gènes permettant la différenciation neuronale tels que *Xash3*, *X-ngn1*, *X-Delta1* et *N-Tubuline* (Papalopulu et Kintner, 1996 ; Franco *et coll.*, 1999). Cette induction de la différenciation neuronale implique la répression de gènes inhibiteurs de la neurogenèse (*Zic2* et *X-Shh* par exemple) par les complexes AR-RAR/RXR (Franco *et coll.*, 1999 ; Bastien et Rochette-Egly, 2004 ; Maden, 2002).

Par ailleurs, des greffes de billes saturées de FGF8 ou d'AR chez l'embryon de poulet ont montré qu'il existe une régulation croisée entre les FGFs et l'AR. En effet, l'AR est capable d'inhiber l'expression de FGF8 dans le tube neural tandis que FGF8 empêche à son tour l'expression de la RALDH-2 (Diez del Corral *et coll.*, 2003). En résumé, le bon développement antéropostérieur du tube neural nécessite la signalisation FGF provenant du PMC, qui maintient la partie caudale du tube dans un état immature pour permettre l'allongement du tube. Au cours de l'allongement du tube neural, les programmes génétiques de spécification et de différenciation des progéniteurs neuronaux sont activés selon un gradient rostro-caudal.

La restriction de l'expression de la RALDH-2 par le signal FGF est cruciale dans l'établissement de la distinction précoce entre cerveau postérieur et moelle épinière. En

effet, l'AR est impliqué dans l'organisation du patron d'expression le long de l'axe AP, suivant un gradient d'AR avec une forte concentration à l'extrémité caudale. La répartition de l'AR dans l'embryon résulte des patrons d'expression complémentaires de RALDH2 et de CYP26A1 (cytochrome P450, enzyme de dégradation de l'AR). RALDH2 est exprimée dans le mésoderme latéral et dans le mésoderme présomitique présomptif, tandis que CYP26A1 est exprimée au niveau des cerveaux moyen et antérieur présomptifs. Les territoires d'expression de RALDH2 et CYP26A1 sont séparés par un espace correspondant au cerveau postérieur présomptif (Niederreither *et coll.*, 1997 ; Swindell *et coll.*, 1999 ; Maden, 1999 ; Niederreither *et coll.* 2000). Ainsi, ces observations renforcent le modèle selon lequel, le gradient en AR se forme entre la moelle épinière présomptive (source) et le cerveau moyen présomptif. Le gradient en AR permet l'induction de l'expression de gènes « postérieurs », (notamment les gènes Hox, Krox20, Pax3, En1, Wnt1,...) et la répression de gènes « antérieurs » tels que Otx2 et Dlx1 (Conlon et Rossant, 1992 ; Andrezzaoli *et coll.*, 1997 ; Koide *et coll.*, 2001 ; Bel-Vialar *et coll.*, 2002 ; Pour revue, Gavalas et Krumlauf, 2000 ; Maden, 2002). Ce gradient est ainsi impliqué dans l'établissement de l'identité moléculaire des segments neuromériques ou rhombomères formés au sein du rhombencéphale. En effet, des expériences de perte et de gain de fonction ont révélé que l'identité de chaque rhombomère est définie par l'expression d'une combinaison de gènes Hox, gènes homéotiques sélecteurs (code Hox). L'expression de certains de ces gènes est extrêmement sensible à la concentration en AR (Jonk *et coll.* 1994 ; Marshall *et coll.*, 1992 ; Niederreither *et coll.*, 2000 ; Pour revue, Maden, 2002 ; Kiecker et Lumsden, 2005).

L'altération de la signalisation AR affecte le développement du cerveau postérieur. En effet, de fortes concentration en AR éliminent ou altèrent la partie antérieure du cerveau postérieur (r1, r2 et r3). A l'opposé, la diminution de la signalisation AR élimine ou altère la partie postérieure du rhombencéphale (r4, r5, r6 et r7) (Marshall *et coll.*, 1992 ; Gould *et coll.*, 1998 ; Godsave *et coll.*, 1998 ; pour revue, Maden, 2002).

D'autres voies de signalisation, telle que la signalisation WNT, sont également impliquées dans l'établissement de la polarité AP.

### **3.1.3. Rôle de la signalisation WNT dans le patron d'expression AP.**

Les WNTs constituent une famille de glycoprotéines sécrétées qui contrôle de multiples processus tels que la prolifération cellulaire, la polarité et les mouvements cellulaires, l'apoptose,... Plusieurs études ont démontré l'importance de la signalisation WNT, dans l'induction du caractère neural caudal. Ainsi, l'activation ectopique de la voie WNT/ $\beta$ -caténine, inhibe la mise en place des structures neurales antérieures (McGrew *et coll.*, 1995 ; McGrew *et coll.*, 1997). À l'opposé, l'inhibition de la signalisation WNT, par la perte de fonction de Wnt8, induit l'expansion de marqueurs antérieurs et l'altération du caractère neural caudal (Glinka *et coll.*, 1997 ; Erter *et coll.*, 2001 ; Lekven *et coll.*, 2001), par exemple.

Il existe un gradient de signalisation WNT qui est impliqué dans la mise en place de l'axe antéropostérieur et notamment dans l'induction de marqueurs du tube neural postérieur (Kiecker et Niehrs, 2001 ; Darken et Wilson, 2001 ; Nordstrom *et coll.*, 2002). La régulation de la signalisation WNT est nécessaire à l'établissement du patron AP du tube neural. En effet, l'activation de la voie WNT est modulée à différents niveaux, par des antagonistes tels que les protéines sécrétées DKK1 (Dickkopf-1) (Glinka *et coll.*, 1998 ; Hashimoto *et coll.*, 2000 ; Kazanskaya *et coll.*, 2000 ; Mukhopadhyay *et coll.*, 2001), Cerberus et FRZB1 (Frizzled-related protein B1), et également les facteurs de transcription Tcf3 et Tcf3b qui régulent négativement la signalisation WNT (Kim *et coll.*, 2000 ; Dorsky *et coll.*, 2003).

### **3.2. Les mécanismes de mise en place de l'axe dorsoventral du tube neural.**

Dans le tube neural, la mise en place de l'axe dorsoventral (DV), comme celle de l'axe antéro-postérieur (AP) implique des facteurs sécrétés ou signaux inducteurs tels que les BMPs, les TGF $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ), les FGFs, l'acide rétinoïque (AR) et la protéine Sonic Hedgehog (SHH). Certains de ces facteurs diffusibles sont synthétisés par des groupes de cellules distinctes localisées soit au pôle dorsal (cellules constituant le toit ou roof plate du tube et une partie des cellules ectodermiques au pôle dorsal du tube), tels que les BMP, soit au pôle ventral (cellules de la plaque du plancher ou floor plate et les cellules de la notochorde), tel que Sonic hedgehog (Shh).

Le tube neural est caractérisé par une organisation originale des différentes populations neuronales suivant l'axe DV. Ces différents facteurs diffusibles (BMPs, TGF- $\beta$ , ...), dont l'expression sous forme de gradient, jouent un rôle crucial dans les mécanismes de détermination de l'identité neuronale et donc dans l'extension de la diversité des populations neuronales présentes dans le tube neural.

Par exemple, dans la moelle épinière adulte, le bon fonctionnement des circuits neuronaux dépend de la mise en place coordonnée des différentes populations neuronales suivant l'axe DV dans la moelle épinière embryonnaire, dans laquelle on distingue dorsalement les futurs éléments sensoriels (interneurones dorsaux) et ventralement les éléments moteurs (interneurones ventraux, neurones moteurs). Les migrations cellulaires permettent ensuite la mixité des neurones nés dans ces deux parties.

Nous nous intéresserons aux mécanismes de spécification des différents types neuronaux dans moelle épinière embryonnaire. En effet, de part son organisation selon l'axe DV, la moelle épinière constitue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes responsables de la diversité neuronale.



#### **4. La spécification des différents types neuronaux dans la moelle épinière embryonnaire.**

Les différents types neuronaux du SNC doivent être générés en nombre suffisant à des positions bien définies et de manière bien coordonnée dans le temps. La spécification neuronale est définie comme étant l'ensemble des mécanismes génétiques et moléculaires responsables de la détermination du devenir des progéniteurs neuronaux, c'est-à-dire, les mécanismes à l'origine de la diversité neuronale. En effet, suivant leur localisation dans le système nerveux embryonnaire (suivant l'axe antéropostérieur et l'axe dorsoventral), les progéniteurs neuronaux auront un destin différent et s'engageront dans des programmes de différenciation distincts. Le devenir des progéniteurs neuronaux est étroitement lié aux processus de mise en place des axes antéropostérieur (AP) et dorsoventral (DV) du tube neural. La production des différents types neuronaux dans l'espace et dans le temps est coordonnée par des programmes développementaux spécifiques en fonction des différentes subdivisions du tube neural suivant les axes AP et DV

##### **4.1. Les mécanismes de spécification et de différenciation neuronale dans la moelle épinière.**

La zone ventriculaire du tube neural embryonnaire qui est composée de progéniteurs neuronaux (cellules pluripotentes indifférenciées), est subdivisée en plusieurs territoires suivant l'axe DV. Cette subdivision en différents territoires de différenciation est définie par des gradients morphogènes dont les mieux décrits sont ceux des BMPs pour la partie dorsale et celui de SHH pour la partie ventrale. Ces gradients morphogénétiques correspondent à des niveaux d'activation différents de ces voies de signalisation, qui contrôlent de manière sélective l'expression de déterminants intrinsèques aux progéniteurs neuronaux. Autrement dit, le devenir des progéniteurs neuronaux, et donc l'activation de l'expression de ces déterminants, dépend de la nature et de la concentration du morphogène à laquelle ils sont exposés. Les différents marqueurs



moléculaires activés au sein d'un programme transcriptionnel permettent de caractériser le type de neurones générés par ce programme.

#### **4.1.1. Spécification neuronale dans la partie dorsale de la moelle épinière.**

##### ***4.1.1.1. Les différentes populations neuronales dorsales.***

Les cellules situées à l'extrémité dorsale du tube neural forment un groupe de cellules qui ne se différencient pas en neurones et qui constituent le toit ou « roof plate » (RP). Il a été établi que les cellules du toit (roof plate) et les cellules de l'ectoderme sus-jacent au tube neural, synthétisent et secrètent des morphogènes, notamment les BMPs, qui sont impliqués dans le patron d'expression de la partie dorsale du tube neural. Dans la zone ventriculaire (ZV) de la partie dorsale du tube neural, on distingue 6 territoires distincts caractérisés, par l'expression de marqueurs moléculaires (Figure 12).

Les progéniteurs neuronaux localisés dans ces différents territoires, génèrent 6 classes d'interneurones dorsaux appelés dl1 à dl6 caractérisés respectivement par l'expression de gènes codant pour des protéines à domaine bHLH (Math1, Mash1, Ngn1 et Ngn2), des gènes Pax dorsaux (Pax3 et Pax7) et de gènes à homéoboîte LIM codant pour des facteurs de transcription tels que Lbx1 et Lmx1 (Helms et Johnson, 2003).

Le patron d'expression de la moelle épinière embryonnaire dorsale dépend de l'activité inductrice des cellules du toit, puisque l'ablation de cette structure, par manipulation génétique, provoque une désorganisation des territoires dorsaux accompagnée de l'absence des populations neuronales correspondantes à ces territoires (Lee *et coll.*, 2000). Les cellules du toit et de l'ectoderme sus-jacent au tube neural expriment des BMPs et notamment BMP4, BMP5 et BMP7. Les BMPs sont des ligands extracellulaires qui appartiennent à la superfamille des TGF- $\beta$  incluant 2 autres sous familles : TGF- $\beta$  et Activine.

La signalisation TGF- $\beta$  contrôle une large gamme de processus tels que la mise en place d'un programme d'expression génétique spécifique de cellule, la prolifération cellulaire, la mort cellulaire programmée ou apoptose et la différenciation cellulaire.

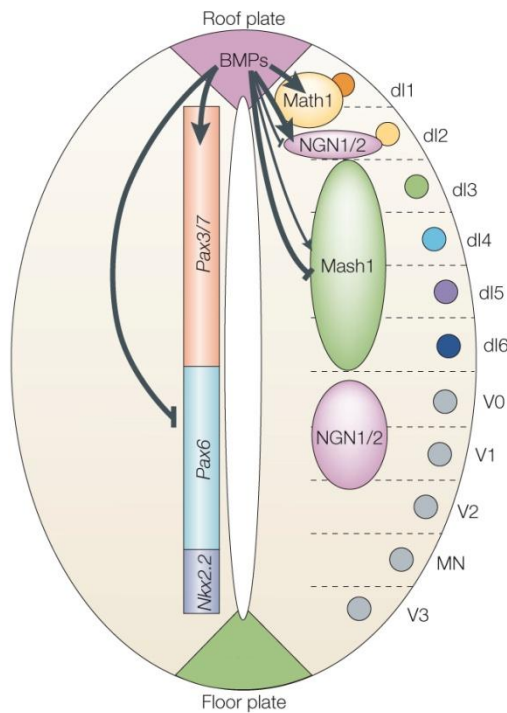


Figure 12| Patron dorsal d'expression génétique de la moelle épinière.

(D'après Liu et Nisweter, 2005)

Représentation schématique de la « roof plate » qui exprime les BMPs et d'autres membres de la famille TGF- $\beta$ . Les progéniteurs neurax sont d'abord subdivisés en larges territoires suivant l'axe dorsoventral, par l'expression différentielle des gènes à homéoboîtes Pax (côté gauche). Les BMPs activent l'expression des gènes Pax dorsaux et définissent la frontière dorsale en réprimant l'expression de Pax6 dans la partie dorsale du tube neural. Le tube neural est alors subdivisé par l'expression de facteurs de transcription à domaine bHLH (côté droit). Ce processus est finement régulé par la voie BMP. Les niveaux élevés de BMPs définissent le domaine Math1 (le plus dorsal) et des niveaux plus faibles définissent les autres populations neuronales moins dorsales qui expriment Neurogénine 1 et 2 (Ngn1/2) ou Mash1.

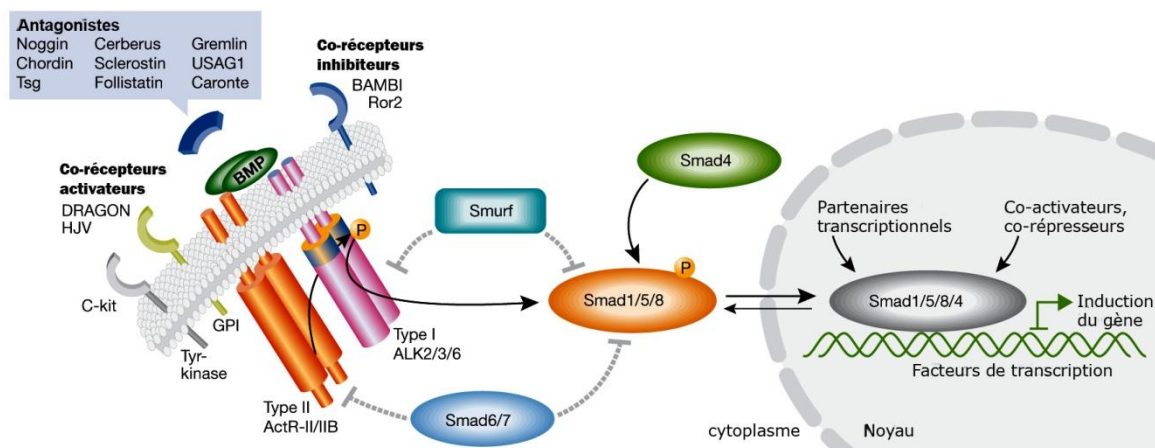


Figure 13| Voie de signalisation des BMPs.

(D'après Simic et Vukicevic, 2007)

Un membre de la famille BMP induit la formation d'un complexe hétérodimérique entre 2 récepteurs BMP (BMPRs). Le récepteur de type II possède une activité kinase qui phosphoryle le récepteur de type I et active la signalisation intracellulaire. BMPR-I active Smad1-Smad5-Smad8 qui forme des complexes hétérodimériques avec Smad4, ces complexes sont transloqués dans le noyau où ils vont agir directement ou indirectement par l'intermédiaire d'autres molécules, pour contrôler l'expression des gènes cibles. Les Smad inhibiteurs (Smad6-Smad7) inhibent spécifiquement la voie BMP. Les antagonistes, les co-récepteurs activateurs ou inhibiteurs et Smurf sont impliqués activement dans le maintien de l'homéostasie du tissu BMP et exercent une régulation croisée avec les autres voies de signalisation.

#### 4.1.1.2. La signalisation BMP.

Les BMPs sont des ligands extracellulaires formant des complexes hétéromériques ou homomériques qui se fixent sur deux types de récepteurs transmembranaires à activité sérine-thréonine kinase. On distingue différents types de récepteurs de type I (ALK2, ALK3/BMPRIA et ALK6/BMPRIB) et de récepteurs de type II (BMPRII, ACTRIIA et ACTRIIB). Lorsque les ligands se fixent sur ces récepteurs, ils activent ces récepteurs qui transduiront le signal par l'intermédiaire de l'activation de différentes protéines appartenant à la famille Smad (Figure 13). Les protéines Smad (homologues des protéines SMA de *C. elegans* et des protéines MAD (mothers against decapentaplegic) de drosophile) jouent un rôle central dans la transduction du signal TGF- $\beta$ . Les protéines Smad sont classées en 3 groupes (Pour revue ; Massagué *et coll.*, 2005) suivant leur fonction :

- ❖ R-Smad (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8) sont régulés par phosphorylation par l'intermédiaire de l'activité sérine/thréonine kinase des récepteurs. Smad1/5/8 sont les principaux transducteurs du signal BMP tandis que Smad2/3 sont les transducteurs du signal TGF $\beta$ /Activine.
- ❖ Co-Smad (Smad4) est le partenaire universel des R-Smad activés.
- ❖ I-Smad sont des inhibiteurs (Smad6 et Smad7).

La fixation des ligands BMP sur les récepteurs BMPRI et BMPRII entraîne l'activation de BMPRII qui va phosphoryler BMPRI, qui à son tour va phosphoryler et activer des R-Smad (Smad1/5/8). Les R-Smad activés vont s'associer à Smad4 (Co-Smad) et former un complexe multimérique Co-Smad/R-Smad. Ce complexe sera transloqué dans le noyau où il va s'associer à des co-activateurs ou des co-répresseurs qui vont se fixer à l'ADN comme facteur de transcription et contrôler l'expression de gènes cibles.

Des études génétiques et moléculaires réalisées chez des embryons de poissons-zèbres mutants présentant divers degrés d'atténuation de la l'activité de la signalisation BMP, ont montré des modifications dans le patron d'expression DV responsable de la perte des neurones sensoriels dorsaux et de l'expansion d'interneurones intermédiaires (Barth *et coll.*, 1999 ; Nguyen *et coll.*, 2000). Ces expériences appuient l'hypothèse du mécanisme dose-dépendant de l'activité des BMPs. Des études menées dans un contexte

de gain de fonction chez l'embryon de poulet, par électroporation de vecteurs permettant l'expression de formes actives du récepteur BMP dans le tube neural, à différentes concentrations, ont révélé l'induction ectopique de Pax7 en position plus ventrale, la répression de Pax6, l'induction de Msx1 et Msx2 et la répression de Dbx1 et de Dbx2. D'autre part, l'activation de la voie des BMPs induit l'expression d'autres gènes de spécification neuronale tels que Cath1 (homologue de Math1), tandis que celle de Cash1 (homologue de Mash1), Ngn1 et Ngn2 est réprimée (Timmer *et coll.*, 2002). Enfin, d'autres expériences de perte de fonction pour les gènes encodant les 2 types de récepteurs BMPRIa et BMPRIb, montre que l'absence de BMPs induit la perte des dI1 et la resspécification de ces interneurons en dI2 (Wine-Lee *et coll.*, 2004). Ces résultats ont confirmé l'existence du gradient morphogène BMP et son rôle crucial dans les mécanismes de spécification des interneurons dorsaux.

Gdf7, un autre membre de la famille des BMPs, est exprimé dans les cellules du toit chez l'embryon de poulet et de souris (Lee *et coll.*, 1998). Gdf7 joue un rôle dans le patron d'expression dorsal car il est capable d'induire l'expression de Math1 (Cath1 chez le poulet) et de spécifier les interneurons dI1.

D'autres signaux extracellulaires provenant des cellules du toit sont également impliqués dans le patron d'expression DV, tels que les WNTs (Wingless integrated) et en particulier WNT1 et WNT3a. Il a été suggéré que ces signaux ont une fonction mitogène, suivant un gradient de concentration tout comme les BMPs. Les embryons de souris portant la double mutation nulle *Wnt1<sup>-/-</sup> ; Wnt3a<sup>-/-</sup>* présentent une expression normale des BMPs et de Gdf7 mais un déficit de neurones dI1 et dI2 et un excès de dI3 (Muroyama *et coll.*, 2002). Cependant, l'étude d'embryons de souris provenant de doubles mutants pour les récepteurs BMPRIa et BMPRIb montre une diminution importante de l'expression de Wnt1 et Wnt3a (Wine-lee *et coll.*, 2004), ce qui indique que les WNTs agissent en aval de la signalisation BMP.

En résumé, les nombreuses expériences de perte et de gain de fonction suggèrent fortement que la signalisation TGF- $\beta$  joue le rôle de morphogène permettant de définir les différents territoires de spécification des interneurons dorsaux en fonction de la concentration en TGF- $\beta$ .

#### **4.1.2. Spécification neuronale dans la partie ventrale de la moelle épinière.**

Dans la partie ventrale de la moelle épinière embryonnaire, l'identification de marqueurs moléculaires, notamment de facteurs de transcription, a permis de mettre en évidence l'existence de 5 territoires de spécification des progéniteurs neuraux. Chaque territoire est caractérisé par l'expression d'une combinaison de gènes qui lui est propre. Ces différents gènes codent pour des facteurs de transcription responsables de la spécification de ces progéniteurs (Ericson *et coll.*, 1997a ; Pierani *et coll.*, 1999 ; Briscoe *et coll.*, 2000). Dans les 5 territoires ventraux, les progéniteurs neuronaux produisent 4 classes d'interneurones ventraux (V0, V1, V2 et V3) et les motoneurones (MN).

Des expériences réalisées chez l'embryon d'amphibien et de poulet, notamment de greffe de notochorde en position ectopique, près du tube neural, ont montré que celle-ci est capable d'induire la formation de cellules de la plaque du plancher (ensemble des cellules les plus ventrales qui séparent les parties gauche et droite du tube) et des territoires ventraux en position ectopique (Watterson *et coll.*, 1955 ; Van Straaten *et coll.*, 1985 ; Jessell et Dodd, 1990 ; Placzek, 1995). De plus, des études moléculaires qui se sont focalisées sur l'identification des signaux moléculaires responsables de l'établissement du patron d'expression DV de la partie ventrale du tube neural ont démontré que la protéine Sonic Hedgehog (SHH), sécrétée par la notochorde et les cellules de la plaque du plancher, joue un rôle crucial dans ce processus développemental.

En effet, le gène *Shh* appartient à la famille Hedgehog qui a été identifiée par homologie avec le gène Hedgehog de drosophile (Echelard *et coll.*, 1993 ; Chang *et coll.*, 1994 ; Roelink *et coll.*, 1994). La famille Hedgehog comprend 3 membres, Desert Hedgehog (Dhh), Indian Hedgehog (Ihh) et Sonic Hedgehog (Shh). Le gène *Shh* code pour une protéine diffusible et est exprimé par les cellules de la notochorde (provient du mésoderme axial) et les cellules de la « floor plate » ou plaque du plancher. L'importance de SHH a été confirmée par de nombreuses expériences en contexte de perte de fonction chez l'embryon (Chiang *et coll.*, 1996 ; Ericson *et coll.*, 1996). Par ailleurs, des expériences de culture d'explants de tube neural *in vitro*, ont démontré que SHH est suffisant pour induire les différentes populations ventrales de moelle épinière en fonction de la concentration en protéine SHH (Marti *et coll.*, 1995 ; Roelink *et coll.*, 1995 ;

Ericson *et coll.*, 1996). Ainsi, de faibles concentrations en SHH sont suffisantes pour induire les populations ventrales les plus éloignées de la source de Shh, comme les interneurons V0, V1 et V2, tandis que des concentrations élevées sont nécessaires pour induire les motoneurons et des concentrations très élevées pour les interneurons V3 et les cellules de la plaque du plancher (Roelink *et coll.*, 1994) (Figure 14).

L'activation ectopique de la signalisation SHH induit la différenciation de neurones ventraux en position ectopique (Hynes *et coll.*, 2000) tandis que le blocage de la signalisation SHH inhibe la génération des neurones ventraux et entraîne l'émergence de neurones présentant des caractéristiques de neurones dorsaux (Wijgerde *et coll.*, 2002 ; Briscoe *et coll.*, 2001).

L'ensemble de ces études conforte le modèle selon lequel, SHH agit en morphogène selon un gradient de concentration qui définit les 5 classes de neurones ventraux en régulant l'expression d'une série de facteurs de transcription qui appartiennent à la famille des protéines à homéodomaine (HD) et également en induisant l'expression d'un facteur de transcription à domaine bHLH, Olig2 (Briscoe *et coll.*, 2000 ; Briscoe et Ericson, 2001 ; Novitch *et coll.*, 2001).

Ces facteurs de transcription ont été subdivisés en 2 classes, en fonction du mode de régulation de leur expression par SHH. L'expression de chaque gène codant des protéines de classe I est réprimée à des seuils distincts de l'activation de la voie SHH, ce qui limite leur expression dans la partie ventrale du tube, tandis que l'expression des gènes codant les protéines de classe II est activée par la signalisation SHH. L'expression des gènes codant les protéines de classe II sera alors limitée dorsalement, du fait de l'éloignement des centres générateurs de SHH. Par ailleurs, des expériences de gain et de perte de fonction, réalisées respectivement chez l'embryon de poulet et de souris, ont mis en évidence l'existence de répressions croisées complémentaires entre les protéines de classe II et les protéines de classe I (Figure 17).

Ces interactions sont responsables de l'établissement des frontières d'expression de ces gènes dans le tube neural ventral et par conséquent de la délimitation des 5 territoires de différenciation (Ericson *et coll.*, 1997b ; Briscoe *et coll.*, 1999, 2000 ; Novitch *et coll.*, 2001).

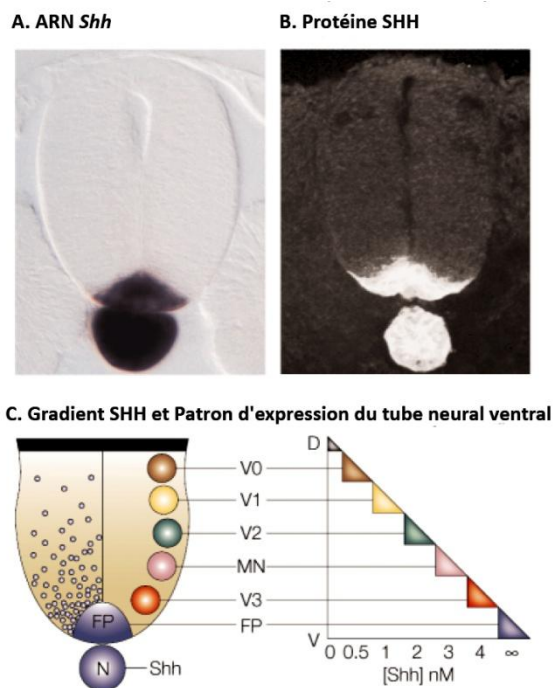


Figure 14| **L'expression de Shh par la notochorde et la floor plate par rapport au patron d'expression ventral du tube neural.**

(D'après Jessell, 2000)

(A) Coupe transversale de moelle épinière d'embryon de poulet au stade HH18 montrant l'expression du gène *Shh* dans la notochorde et la « floor plate » (par hybridation in situ).

(B) Coupe transversale de moelle épinière d'embryon de poulet au stade HH18 montrant l'expression de la protéine SHH par la notochorde et la « floor plate ».

(C) Exemple d'un modèle résumant l'influence de Shh sur la spécification de l'identité des progéniteurs neuronaux de la partie ventrale du tube neural. Dans la partie gauche du tube neural ventral, le gradient d'activité SHH est représenté par des points bleus distribués suivant un profil : haut niveau d'activité SHH en ventral et faible niveau d'activité SHH en dorsal. Dans la partie droite du tube neural, les 5 classes de neurones générées en réponse au gradient de signalisation SHH. V0-V3 indique 4 classes différentes d'interneurones ventraux. MN indique les motoneurones et FP pour la « floor plate ». A droite, le profil de génération des neurones à partir d'explants de tube neural cultivés en présence de différentes concentrations du fragment N-terminal recombinant de SHH, appelé N-SHH.

D : tube neural dorsal, V : tube neural ventral

#### 4.1.2.1. *La transduction du signal Sonic Hedgehog.*

Dans les cellules de la notochorde et de la plaque du plancher, qui synthétisent SHH, la protéine SHH subit un clivage protéolytique lié à l'activité protéase de son propre domaine catalytique localisé dans la partie C-terminale. Le fragment N-terminal-SHH (N-SHH) va subir deux modifications post-transcriptionnelles :

- ❖ Ajout d'un groupe cholestérol à l'extrémité N-terminale.
- ❖ Ajout d'un groupe palmitoyl à l'extrémité C-terminale.

Dans tous les systèmes sensibles à SHH, ces modifications jouent un rôle important dans la régulation de l'activité de N-SHH puisque ces modifications favorisent la sécrétion et l'activité à longue distance de N-SHH. Par exemple dans la moelle épinière ventrale, après sécrétion de la protéine N-SHH par les cellules de la plaque du plancher, un gradient morphogène ventrodorsal s'établit. N-SHH se fixe sur le récepteur Patched1 (Ptc1) présent à la surface des cellules cibles, ce qui entraîne l'activation d'une cascade d'évènement dans la cellule receveuse du signal (Pour revue ; Riobo et Manning, 2007) (Figure 15).

Le récepteur Ptc1 est une protéine à 12 domaines transmembranaires qui, lorsqu'il n'est pas activé, inhibe une autre protéine à 7 domaines transmembranaires couplée à une protéine G, appelée Smoothened (Smo). L'interaction du récepteur Ptc1 avec N-SHH abolit l'effet inhibiteur de Ptc sur Smo qui va transduire le signal SHH vers le noyau de la cellule receveuse. Le processus de transduction du signal SHH par l'activation de Smo, encore mal connu chez les vertébrés, est contrôlé par des interactions complexes et des modifications d'un grand nombre de protéines cytoplasmiques (Ingham *et coll.*, 2001). Des études moléculaires effectuées chez la drosophile ont été très utiles pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires basiques de transduction du signal SHH.

Chez les vertébrés, 3 gènes Gli distincts, homologue à Ci (Cubitus interruptus), ont été identifiés. Gli1, Gli2 et Gli3 sont tous les 3 exprimés dans le tube neural (Hui *et coll.*, 1994 ; Lee *et coll.*, 1997 ; Sasaki *et coll.*, 1997 ; Ruiz i Altaba, 1998, 1999).

Les gènes de la famille Ci/Gli codent pour des facteurs de transcription comprenant un domaine de fixation à l'ADN très conservé, contenant 5 doigts de zinc de



type C2-H2. Toutes les protéines Ci/GLI ont la capacité de se fixer sur l'ADN au niveau d'une séquence consensus de type GACCACCCA (Kinzler et Vogelstein, 1990). De plus, les facteurs de transcription GLI possèdent un domaine C-terminal transactivateur mais seul GLI2 et GLI3 possèdent un domaine répresseur N-terminal.

Le contrôle de l'activité de Ci implique de nombreux facteurs qui interagissent avec Ci et modifient la protéine Ci (excision, clivages protéolytiques).

En effet, en absence d'activation de Ptc par SHH, la protéine Ci est associée à un complexe dans le cytoplasme, par l'intermédiaire de la protéine Cos-2 (Costal-2 est une protéine appartenant aux kinésines). Ce complexe contient la protéine kinase Fu (Fused) et la protéine SuFu (Suppressor of Fused), et il modifie Ci en répresseur de la transcription CiR afin de réprimer l'expression des gènes cibles de SHH. De plus, CiR est impliqué dans la phosphorylation de Ci par la PKA (Protéine Kinase A), GSK3 (Glucose synthase kinase-3) et Slmb (Supernumerary limbs). La fixation de N-SHH sur Ptc permet la levée de l'inhibition de Smo. L'activation de Smo entraîne le recrutement du complexe Cos-2 probablement par l'activité kinase de Fus et SuFu et la libération de la protéine Ci entière, sous forme d'activateur transcriptionnel qui va être transloqué dans le noyau pour activer les gènes cibles de SHH (Pour revue Hooper et Scott, 2005 ; Lum *et coll.*, 2003) (Figure 15).

L'homologue de SuFu chez les vertébrés a été identifié et joue un rôle crucial dans la régulation négative des protéines GLI, en les séquestrant dans le cytoplasme (Kogerman *et coll.*, 1999). Les mécanismes de contrôle de l'activité de SuFu chez les vertébrés ne sont pas encore totalement élucidés et pourraient être divergents par rapport à la drosophile.

Chez les vertébrés, l'activation de la voie SHH induit la formation de la forme activatrice de GLI2 qui induira GLI1 (activateur constitutif) tandis que l'absence d'activation de la voie SHH conduit à l'activation de la forme répressive de Gli3 (Figure 16). La modification du domaine N-terminal de GLI2 et GLI3 par le complexe Cos-2/Fu-SuFu pourrait être une étape critique dans le contrôle de l'activité transcriptionnelle des protéines Glis puisque la délétion de ce domaine convertit GLI2 et GLI3 en activateurs constitutifs (Sasaki *et coll.*, 1999).

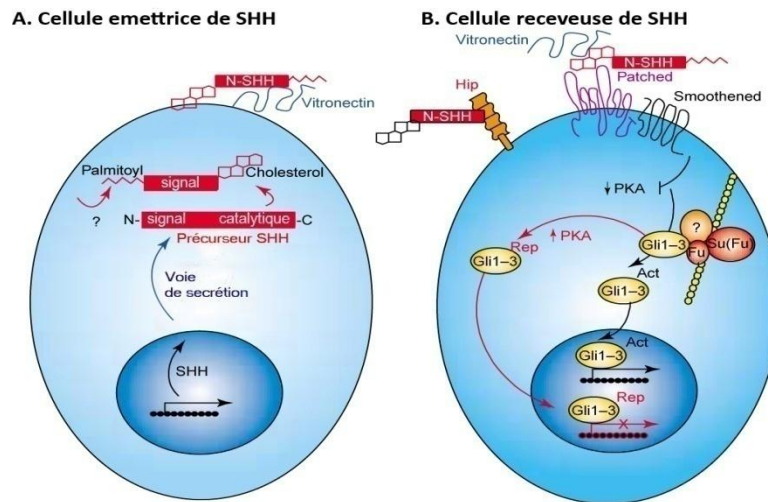


Figure 15| Représentation schématique de la voie Sonic Hedgehog (SHH).

(Adapté d'après Marti et Bovolenta, 2002)

Seuls les composants de la voie SHH identifiés chez les vertébrés sont représentés.

(A) Le précurseur SHH subit un clivage protéolytique pour produire le morphogène N-SHH dans lequel 2 modifications ont été introduites : addition d'un groupe cholestérol à la partie C-terminale et une partie palmitoyl à l'extrémité N-terminale. Le groupe cholestérol est ajouté par la partie catalytique intrinsèque C-SHH tandis que le groupe palmitoyl est ajouté par un composant inconnu chez les vertébrés.

(B) Plusieurs composants de la voie SHH ont été identifiés chez les vertébrés à partir de leur homologie avec les protéines de la drosophile : les composants du récepteur Patched et Smoothed, et le complexe intracellulaire formé par Fused (Fu), Suppressor of fused (SuFu) et peut être d'autres composants (?), qui pourraient être associés aux microtubules (comme chez la drosophile). Les facteurs de transcriptions à doigts de zinc de la famille Ci/Gli (Gli1-3) pourraient être associés avec ce complexe intracellulaire et transloqués dans le noyau après activation de la voie SHH afin d'exercer leur fonction de régulateur de la transcription en réponse au signal SHH.

Act : activation, Hip : Hedgehog interacting protein, PKA: Protein kinase A, Rep: répression

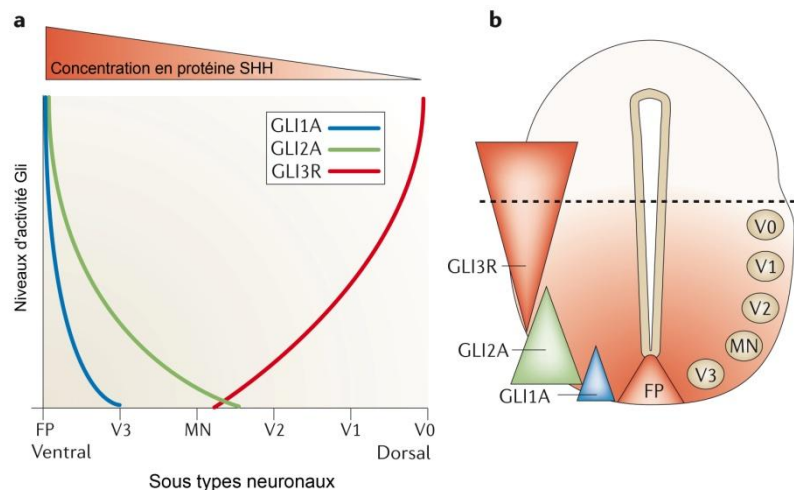


Figure 16| Le gradient Sonic Hedgehog module l'expression des formes activateurs et répresseurs des protéines Glis et se traduit par l'émergence de types cellulaires distincts.

(Adapté d'après Fuccillo et coll., 2006)

Les concentrations en Sonic Hedgehog les plus élevées induisent la production de l'activateur transcriptionnel Gli1 (GLI1A), l'activateur Gli2 (GLI2A) par un contrôle de la transcription et également l'inhibition du répresseur Gli3 (GLI3R) par un clivage de la forme entière de la protéine GLI3. L'activation de la voie SHH induit la spécification de la « floor plate » et des interneurons V3.

Les faibles niveaux de GLI2A et l'inhibition de GLI3R induit les interneurons V2 et les motoneurons (MN). Le patron d'expression des interneurons V0 et V1 est largement contrôlé par le niveau de GLI3R.

(a) Activités relatives hypothétiques des activateurs et répresseurs GLI dans la moelle épinière embryonnaire de mammifère. (b) Diagramme schématisant (à gauche) illustrant l'activité des activateurs et répresseurs GLI comparé à la position des neurones ventraux (à droite) générés par l'activité de la voie SHH.

L'inactivation ou les knock in croisés de gènes Gli ont montré qu'au cours de la spécification dans la partie ventrale du tube neural, GLI3 agit principalement comme un répresseur de la transcription tandis que GLI1 et GLI2 sont principalement des activateurs transcriptionnels (Matisse *et coll.*, 1998 ; Park *et coll.*, 2000 ; Persson *et coll.*, 2002 ; Bai *et coll.*, 2002 ; Bai *et coll.*, 2004).

Par ailleurs, GLI2 et GLI3 modulent la transcription de GLI1 en se fixant directement sur la séquence consensus Gli présente sur le promoteur de Gli1. Ainsi, GLI1 peut être considéré comme un marqueur de l'activation de la voie SHH car sa transcription est activée en réponse au signal SHH. La complexité de la fonction des Glis et de leur mode de régulation est accrue par le fait que les facteurs de transcription GLIs peuvent former des homodimères et/ou des hétérodimères (Nguyen *et coll.*, 2005).

Un modèle élégant permettant de mieux comprendre le rôle du gradient SHH au cours de la spécification des progéniteurs de la partie ventrale du tube neural, a été proposé (Ericson *et coll.*, 1995 ; Ruiz i Altaba, 1998). Ce modèle est basé sur l'établissement d'un gradient d'activité GLI par le gradient SHH. En absence de l'activation de la voie SHH, l'activité « répresseur » est dominante et inhibe le devenir ventral des progéniteurs neuraux. L'activation de la voie SHH inhibe l'activité « répresseur » de GLI3 (GLI3R) et induit simultanément, la forme « activatrice » de GLI2 (GLI2A). La distance entre les progéniteurs neuraux receveurs et les cellules émettant le signal SHH détermine l'équilibre entre répression et activation. Par exemple, les cellules proches de la source de SHH (à proximité des cellules de la plaque du plancher) présenteront un niveau de GLI2A très élevé et un niveau de GLI3R très faible. Cet équilibre de l'activité des Glis apporte donc une information positionnelle par rapport à la source de SHH. Les interactions entre GLI2A/GLI3R et les cibles de la voie SHH contrôlent ainsi l'expression des facteurs de transcription dans ces cellules. En résumé, le gradient de concentration extracellulaire en morphogène SHH est corrélé aux différents niveaux d'activité des GLI dans les cellules neurales (Figure 16).

La fonction activatrice de GLI2 (GLI2A) est essentielle pour l'induction de la plupart des neurones de la partie ventrale de la moelle épinière embryonnaire (Matisse *et coll.*, 1998 ; Litington et Chiang, 2000 ; Motoyama *et coll.*, 2003 ; Ruiz i Altaba, 1998). Tandis que les différents niveaux d'expression de la forme répressive de Gli3 contrôlent

le nombre et la localisation des progéniteurs des interneurons V0, V1 et V2 (Persson *et coll.*, 2002).

En résumé, la signalisation SHH exerce la fonction de régulateur négatif dans le patron d'expression de la partie intermédiaire de la moelle épinière ventrale tandis qu'elle assure une fonction d'activateur pour les territoires des progéniteurs des motoneurons et des interneurons V3, où la concentration en SHH est très importante.

Cependant, des interneurons V0, V1, V2 et des motoneurons (MNs) peuvent être générés en absence de SHH et de l'activité des GLIs. En effet, l'analyse des embryons de souris possédant la double mutation KO pour Gli2 et Gli3 ou Shh et Gli3, a révélé que les MNs, V0, V1 et V2 étaient encore générés dans le tube neural mais pas ségrégués dans des territoires distincts (Lei *et coll.*, 2004). Ces études suggèrent que le rôle principal de la voie SHH/GLI est de contrôler la distribution spatiale des progéniteurs neuronaux dans la partie ventrale de la moelle épinière ventrale (c'est-à-dire, délimiter les 5 territoires de progéniteurs suivant l'axe DV). Toutefois, d'autres voies de signalisation sont capables de moduler le signal SHH et sont impliquées dans l'établissement du patron d'expression ventral, telles que la voie TGF $\beta$ /BMP, la voie WNT, la signalisation acide rétinoïque et la voie FGF (Capdevila *et coll.*, 1998 ; Borycki *et coll.*, 2000 ; Kuschel *et coll.*, 2003 ; Appel et Eisen, 2003).

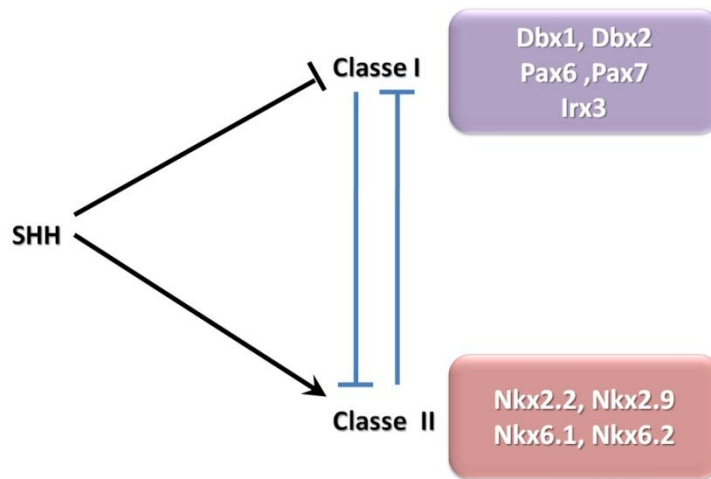


Figure 17| Schéma résumant les interactions géniques basiques nécessaires à la mise en place du patron d'expression ventral du tube neural.

Le gradient SHH induit la répression des protéines à homéoboîte de classe I et active l'expression des protéines de classe II. Les répressions croisées entre paires de protéines de classe I et de classe II contrôlent la délimitation des 5 territoires de progéniteurs et la spécification de l'identité des neurones ventraux.

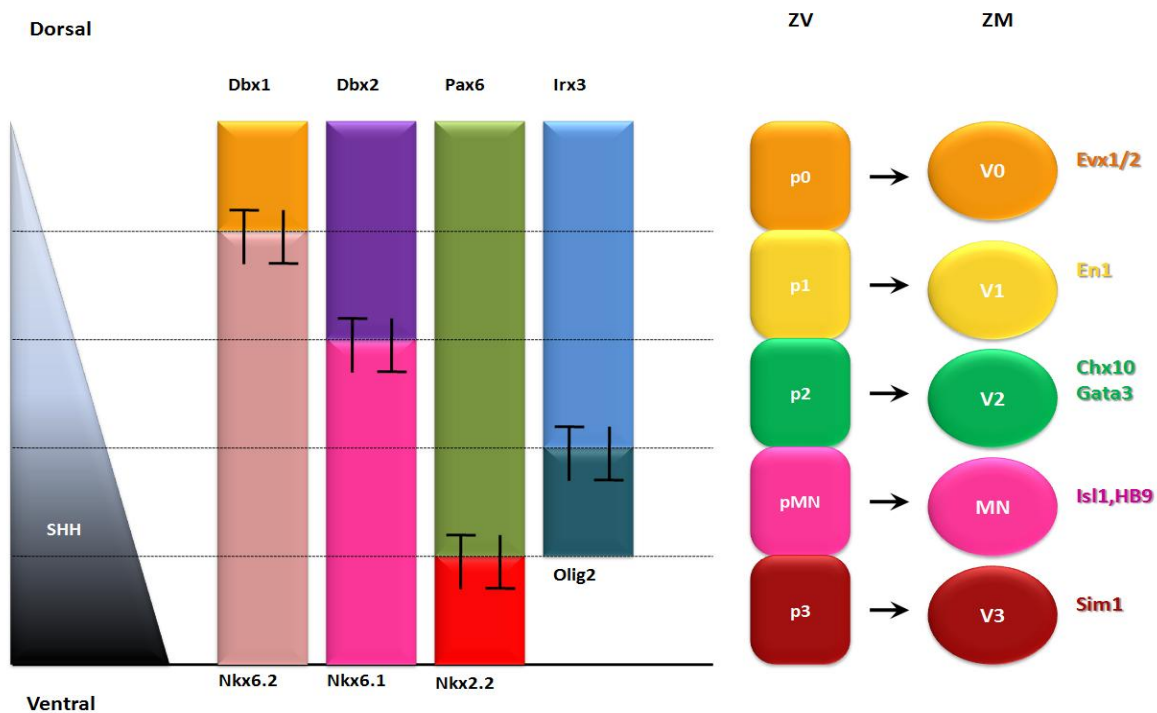


Figure 18| La signalisation Sonic Hedgehog contrôle le patron d'expression ventral et la spécification de l'identité des neurones ventraux.

Le gradient de concentration en protéine SHH induit la délimitation de 5 territoires dans la zone ventriculaire de la partie ventrale du tube neural (p3, pMN, p2, p1 et p0). Chaque territoire exprime une combinaison de gènes et les frontières entre ces différents territoires sont définies par les répressions croisées. Chaque combinaison de gènes impose le choix de différenciation de progéniteurs neuronaux en interneurones V3, V2, V1 et V0 dans les territoires p3, p2, p1 et p0 et aussi en motoneurones pour le territoire pMN. Une fois spécifié, les progéniteurs neuronaux sortent du cycle cellulaire et migrent vers la zone du manteau où ils vont achever leur processus de différenciation respectif.

#### **4.1.2.2. Rôle de la signalisation BMP dans le patron d'expression ventral.**

Concernant la voie de signalisation des BMP, de nombreuses observations suggèrent que les BMPs pourraient avoir une influence sur le patron d'expression DV dans la partie ventrale du tube neural. En effet, une étude a montré que les BMP peuvent induire l'expression de Rab23, un régulateur négatif de la signalisation SHH (Eggenchwiler *et coll.*, 2001 ; Eggenchwiler *et coll.*, 2006). De plus, des études génétiques chez l'embryon de souris portant la mutation nulle *noggin* (*noggin* étant un inhibiteur des BMPs), ont révélé que les MNs et les interneurons ventraux sont fortement déplétés malgré une expression normale de SHH. L'incubation d'explants de tube neural avec SHH et BMP7 induit les mêmes effets que la mutation nulle *noggin* tandis que l'incubation en présence de SHH et follistatine (inhibiteur des BMPs) a un effet opposé (Liem *et coll.*, 2000). La surexpression de *chordin* (inhibiteur des BMPs) et de follistatine induit l'expansion des territoires ventraux, aux dépens des territoires dorsaux (Liem *et coll.*, 2000 ; Patten et Placzek, 2002).

D'autre part, d'autres expériences de culture d'explants de tube neural ont révélé que les BMPs pourraient antagoniser l'activité SHH puisque les BMPs maintiennent l'expression de *Gli3*. Enfin, des études génétiques effectuées chez des embryons de souris KO conditionnel de la signalisation BMP, ont montré que dans le tube neural, il n'y avait pas d'expansion des territoires ventraux aux dépens des territoires dorsaux, mais uniquement des modifications dans le territoire de spécification le plus dorsal (territoire p0 et p1). L'ensemble de ces données suggèrent que, l'inhibition de la voie BMP dans la partie ventrale du tube neural, pourrait constituer une étape essentielle dans la spécification des neurones ventraux (Pour revue ; Lupu *et coll.*, 2006).

#### **4.1.2.3. Rôle de la signalisation FGF et Acide Rétinoïque dans le patron d'expression ventral.**

Dans la partie antérieure de la moelle épinière embryonnaire, l'acide rétinoïque (AR) peut jouer un rôle important dans la spécification des progéniteurs neuronaux des territoires p0 et p1 (Wilson *et coll.*, 2004). Des expériences de co-cultures d'explants de

tube neural en présence d'explants de mésoderme somitique (source d'AR) ont démontré que l'AR induit la différenciation d'interneurones V0 et V1 (Pierani *et coll.*, 1999 ; Novitch *et coll.*, 2003 ; Wilson *et coll.*, 2004). Inversement, la spécification de ces mêmes interneurones est altérée chez des embryons de caille déficients en vitamine A (VAD) a révélé que (Wilson *et coll.*, 2004). De plus, des études génétiques réalisées chez la souris (et notamment chez les doubles mutants *Shh*<sup>-/-</sup> ; *Gli3*<sup>-/-</sup>, *Smo*<sup>-/-</sup> ; *Gli3*<sup>-/-</sup> et *Gli2*<sup>-/-</sup> ; *Gli3*<sup>-/-</sup>) suggèrent fortement que la spécification dans les territoires p0 implique la signalisation AR, tandis que celle du territoire p1 implique la signalisation SHH et AR (Maden, 2006 ; Pour revue, Lupo *et coll.*, 2006). L'idée que l'AR peut interférer dans l'établissement du patron d'expression DV est appuyée par l'observation selon laquelle l'expression des gènes codant les protéines de classe I est modulée dans des explants de tube neural cultivés en présence d'AR (Novitch *et coll.*, 2003).

D'autre part, la signalisation AR est également impliquée, à différents stades (progéniteur et neurones post-mitotiques), dans la spécification des motoneurones (Novitch *et coll.*, 2003) et également dans la différenciation des sous-types de motoneurones innervant les membres supérieurs (Sockanathan *et coll.*, 2003). En effet, des études réalisées chez l'embryon de caille déficient en vitamine A (mutant VAD), ont montré que l'expression d'Olig2 est diminuée (Diez del Corral *et coll.*, 2003). L'AR et SHH ont un rôle complémentaire dans la spécification des MNs, car l'AR induit l'expression de Pax6, tandis que SHH induit Nkx6.1. Secondairement, dans les progéniteurs Nkx6.1+/Pax6+, l'AR est capable d'induire l'expression d'Olig2, qui est nécessaire à la spécification des MNs (Novitch *et coll.*, 2003 ; Appel et Eisen, 2003).

La signalisation FGF semble jouer un rôle important dans le patron d'expression DV. En effet, les FGFs produits par le mésoderme présomitique adjacent et par les cellules de la plaque du plancher, assurent deux fonctions dans les progéniteurs neuraux. Premièrement, ils agissent comme des inhibiteurs de la différenciation neuronale en maintenant les progéniteurs neuraux dans un état mitotique indifférencié (Mathis *et coll.*, 2001 ; Diez del Corral *et coll.*, 2002 ; Diez del Corral *et coll.*, 2003). Deuxièmement, ils répriment l'expression des gènes codant pour les protéines de classe I et de classe II, et inhibent ainsi le patron d'expression DV (Bertrand *et coll.*, 2000 ; Diez del Corral *et coll.*, 2003 ; Novitch *et coll.*, 2003). Des études ont montré également que les FGFs sont capables d'induire l'expression de Gli3 et Gli2 et par conséquent, moduler la

signalisation SHH (Brewster *et coll.*, 2000 ; Ruiz i Altaba *et coll.*, 2002 ; Gutin *et coll.*, 2006).

En résumé, l'acide rétinoïque (AR) antagonise l'effet des FGFs et joue un rôle majeur dans l'établissement du patron d'expression DV par sa capacité à induire l'expression des protéines de classe I et à limiter l'effet ventralisant induit par SHH.

#### **4.1.3. Contribution du code transcriptionnel dans la spécification des progéniteurs ventraux.**

Les facteurs de transcription Glis transduisent le signal SHH et sont par conséquent, impliqués dans les mécanismes de spécification des progéniteurs ventraux. Ils participent à l'inhibition de l'expression des facteurs de transcription à homéodomaine de classe I tels que Pax6, Pax7, Irx3, Dbx1 et Dbx2 et à l'induction de l'expression des facteurs de transcription à homéodomaine de classe II tels que Nkx2.2, Nkx2.9, Nkx6.1 et Nkx6.2 (Briscoe *et coll.*, 1999, 2000). Des répressions croisées se mettent ensuite en place pour définir les différents territoires. En effet, Pax6 (classe I) réprime l'expression de Nkx2.2 (classe II) et inversement Nkx2.2 réprime l'expression de Pax6, tandis que Dbx2 (classe I) réprime l'expression de Nkx6.1 (classe II) et inversement (Ericson *et coll.*, 1997a ; Briscoe *et coll.*, 2000) (figure 17). Toutefois, aucun gène codant un facteur de transcription de classe II complémentaire au facteur de transcription de classe I Pax7, n'a pu être déterminé.

Dans le territoire d'expression de la combinaison Nkx6.1/Pax6, en présence d'Olig2, les progéniteurs neuronaux seront spécifiés en MNs avec l'activation des gènes codant les facteurs de transcription MNR2 (Motor neuron restricted 2), HB9 (Homeobox gene 9), Isl1 (Islet-1) et Lhx3 (LIM homeobox 3) qui renforcent l'identité motoneuronale (Pfaff *et coll.*, 1996 ; Tanabe *et coll.*, 1998 ; Arber *et coll.*, 1999 ; Thaler *et coll.*, 1999). L'activation du programme de détermination des V2, caractérisés par l'expression de Chx10 et Gata3, semble être contrôlée par Irx3 dans le territoire d'expression de Nkx6.1/Pax6 (Briscoe *et coll.*, 2000).

Les progéniteurs du territoire p0 sont définis par la combinaison Dbx1/2, Pax6 et Irx3 et vont générer les interneurons V0 qui exprimeront les marqueurs post mitotiques Evx1 et Evx2 (Even skipped homeobox gene 1/2).



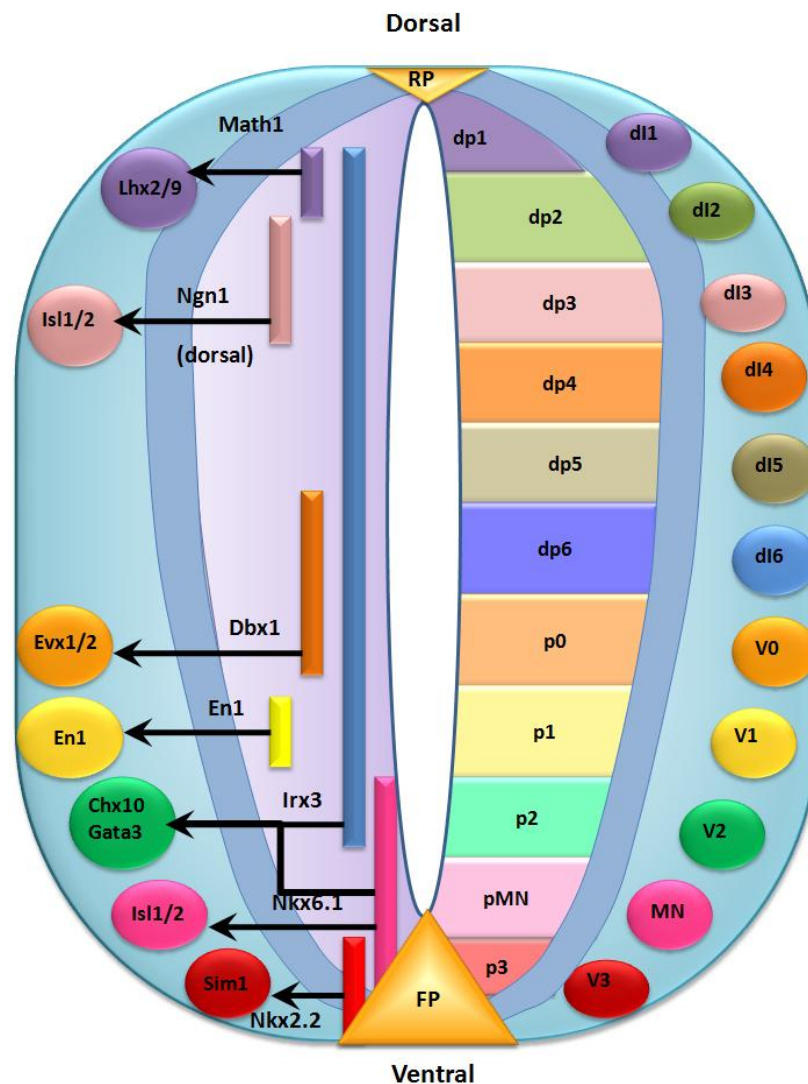


Figure 19| Spécification de l'identité des sous-types neuronaux dans la moelle épinière embryonnaire.

(Adapté d'après Diez del Corral et Storey, 2001)

A droite, les neurones (cercles) dans le tube neural sont identifiés par leur combinaison de facteurs de transcription qui leur est caractéristique.

Les différentes classes d'interneurones et les motoneurones dérivent des progéniteurs localisés dans les territoires correspondants (dp1 à p3), suivant le patron d'expression dorsoventral. La plupart de ces neurones proviennent de territoires spécifiques qui sont situés dans la zone ventriculaire. A gauche : l'identité neuronale est acquise quand les progéniteurs sont encore dans la zone ventriculaire, dans les territoires spécifiques. Ces territoires de progéniteurs expriment des combinaisons distinctes d'autres groupes de facteurs de transcription (voir barre verticale) en fonction de leur position suivant l'axe dorsoventral (par exemple, Nkx6.1 et Irx3 pour les interneurones V2 ou encore Nkx2.2 pour les interneurones V3). L'expression ectopique de ces gènes indiqués à gauche, montre qu'ils sont capables d'induire l'expression des gènes spécifiques des types neuronaux correspondant (Nkx6.1 induit l'expression d'Isl1/2). Pour simplifier ce schéma, seul les groupes de gènes impliqués dans l'établissement des territoires de progéniteurs sont représentés.

FP : floor plate, RP : roof plate

Dans le territoire p1 défini par Dbx2, Pax6 et Irx3, les progéniteurs donneront naissance aux interneurons V1 qui exprimeront le marqueur post mitotique En1 (Engrailed-1). Enfin, le territoire p3 défini par l'expression de Nkx2.2 donne naissance aux interneurons V3 qui expriment Sim1 (homologue de Single minded-1 de drosophile) (Pour revue Jessell, 2000) (Figure 19).

L'ensemble de ces études génétiques révèlent la grande complexité des réseaux d'interactions génétiques qui contrôlent le devenir des progéniteurs neuronaux dans la moelle épinière ventrale embryonnaire.

#### **4.1.4. La diversité neuronale dans la moelle épinière ventrale.**

Les 5 classes de neurones ventraux sont caractérisées respectivement, par l'expression de marqueurs post-mitotiques distincts. Ces marqueurs post mitotiques tels qu'Evx1/2, En1, Chx10/Gata3, Isl1/2 et Sim1 sont activés en aval de la combinatoire des facteurs de transcription de classe I et de classe II. Ces marqueurs sont impliqués dans les programmes de différenciation respectifs de chacune de ces 5 classes de neurones ventraux.

L'émergence des différents sous types neuronaux à des positions bien définies dans la moelle épinière est nécessaire pour l'assemblage des circuits neuronaux fonctionnels. Ainsi, d'autres mécanismes se produisant dans les neurones post-mitotiques assurent une augmentation de la diversité neuronale au sein de ces 5 principales classes de neurones.

Par exemple, dans le territoire pMN, plusieurs sous types de motoneurons sont générés et définis par la combinaison de facteurs de transcription de type LIM tels qu'Isl1, Isl2, Lhx3 et d'autres facteurs tels que Hb9 et MNR-2. La génération de différents sous types de MNs est nécessaire pour assurer diverses fonctions et innover différents types de muscles (Liu *et coll.*, 2001 ; Allan *et coll.*, 2003). Un autre exemple est représenté par les interneurons V2. Chez ces interneurons, l'expression de facteurs de transcription additionnels tels que CHX10 (ceh-10 homeo domain containing homolog 1) et GATA3, permet de subdiviser la population des interneurons V2 en 2 sous types, V2a et V2b. Ces deux sous-populations sont générées et réparties dans le même

territoire (Karunaratne *et coll.*, 2002 ; Smith *et coll.*, 2002). On peut remarquer que les territoires pMN et p2 qui génèrent respectivement les motoneurones et les interneurones V2 sont localisés dans le domaine d'expression du gène Nkx6.1. Ceci suggère un rôle important de Nkx6.1 dans la spécification de ces 2 classes de neurones et également, l'existence d'interactions entre les programmes respectifs de spécification des motoneurones et des interneurones V2.

## **4.2. La spécification des progéniteurs du territoire Nkx6.1.**

En effet, chez l'embryon de souris Nkx6.1<sup>-/-</sup>, la différenciation des motoneurones et des interneurones V2 est fortement réduite et entraîne une expansion du territoire p1 ventralement, en remplacement des interneurones V2 et motoneurones (Sander *et coll.*, 2000). Des expériences de gain de fonction de Nkx6.1 chez l'embryon de poulet ont montré que Nkx6.1 est capable de générer des interneurones V2 (en présence d'Irx3) et des MNs en absence d'Irx3 (Briscoe *et coll.*, 2000) en position ectopique. En résumé, dans le territoire d'expression du gène Nkx6.1, 3 classes de neurones sont générées en fonction de l'expression d'autres facteurs de transcription associés à Nkx6.1, tels qu'Irx3, Olig2 et Nkx2.2 (Briscoe *et coll.*, 2000). Ainsi, en absence de Irx3 et de Nkx2.2, les progéniteurs Nkx6.1+ donneront naissance aux motoneurones (Briscoe *et coll.*, 2000) alors que l'expression de Nkx2.2 et Irx3 dans le territoire d'expression de Nkx6.1 sera nécessaire à l'induction des interneurones V3 et V2 (Briscoe *et coll.*, 1999, 2000).

### **4.2.1. La spécification des motoneurones.**

Les interactions entre les protéines à homéodomaine de classe I et de classe II sont donc cruciales pour la spécification des différentes classes neuronales car elles contrôlent l'activation des programmes génétiques spécifiques de chaque type neuronal. Dans le cas des motoneurones (MNs), Nkx6.1 joue un rôle majeur puisqu'en absence d'Irx3 et de Nkx2.2, il active l'expression du gène Olig2 (gène codant un facteur de transcription à domaine bHLH) uniquement dans le territoire pMNs. Ceci suggère un rôle important d'Olig2 dans la différenciation des MNs. En effet, Olig2 a une fonction

paradoxe au cours de la neurogenèse puisqu'il induit l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des MNs mais il est également impliqué dans la spécification des OPCs (précurseurs des oligodendrocytes) issus des progéniteurs neuronaux du territoire pMN, en oligodendrocytes (Lee *et coll.*, 2005). Ce mécanisme de spécification des oligodendrocytes, intervenant après la génération des MNs implique l'inhibition du programme de différenciation des MNs (Lee *et coll.*, 2005).

Olig2 est un répresseur transcriptionnel qui coordonne de nombreuses étapes dans la génération des motoneurones, en aval des gènes à homéodomaine de classe I et II. Ainsi, Olig2 est nécessaire à la mise en place du territoire de spécification MNs en réprimant *Irx3*. Il est impliqué dans l'activation du programme de différenciation des motoneurones (Mizuguchi *et coll.*, 2001 ; Novitsch *et coll.*, 2001) en induisant l'expression de facteurs de transcription tels que *Ngn2*. *Ngn2* induit à son tour l'expression de *NeuroM* (gène pan-neuronale codant un facteur de transcription à domaine bHLH), *Lhx3*, *Isl1/2* et *MNR2/Hb9* (Lee et Pfaff, 2003 ; Lee *et coll.*, 2004). Par ailleurs, des expériences de gain de fonction chez l'embryon de poulet ont confirmé l'importance de ces gènes dans l'émergence des MNs puisque l'induction ectopique de la combinaison *Lhx3* et *Isl1* ou de *MNR2/Hb9* est suffisante pour induire la différenciation des progéniteurs neuronaux en MNs et réprimer la différenciation d'une population de neurones adjacents, les interneurones V2 (Pfaff *et coll.*, 1996 ; Tanabe *et coll.*, 1998 ; Arber *et coll.*, 1999 ; Thaler *et coll.*, 1999 ; William *et coll.*, 2003). L'activation de l'expression de *Hb9/MNR2* résulte d'interactions synergiques entre *Lhx3*, *Isl1*, *Ngn2* et *NeuroM* qui forment un complexe activateur de la transcription. Ce complexe transactivateur se fixera sur plusieurs régions cis-régulatrices du gène *Hb9* afin d'activer l'expression de ce gène (Lee et Pfaff, 2003 ; Lee *et coll.*, 2004).

Durant la maturation des précurseurs des MNs, Olig2 et *Ngn2* sont exprimés à des niveaux qui déterminent le devenir de ces précurseurs (différenciation ou maintien à l'état de progéniteur). Ainsi, il existe une compétition entre Olig2 et *Ngn2* pour la fixation sur la « boîte E » à l'intérieur du promoteur de *Hb9*, dans les précurseurs des MNs. La fixation de *Ngn2/NeuroM* sur la « boîte E » du promoteur de *Hb9* permettrait l'activation de la transcription de ce dernier et induit la différenciation des MNs. À l'opposé, la fixation d'Olig2 inhiberait la fixation de *Ngn2* sur la « boîte E » et par conséquent, réprimerait l'expression de *Hb9* (Lee *et coll.*, 2005). Les mécanismes qui

contrôlent le niveau d'expression de *Ngn2* jouent un rôle majeur dans le développement et la maturation des MNs.

#### **4.2.2. Les différents sous-types de motoneurones.**

Dans la moelle épinière ventrale, les MNs sont subdivisés en plusieurs sous types par des mécanismes post-mitotiques. Les sous-classes de MN sont organisées en colonnes longitudinales, dont la localisation est bien définie, et innervent des muscles distincts (Tsuchida *et coll.*, 1994). La subdivision des MNs en colonnes est liée à l'expression différentielle de combinaison de facteurs de transcription tels que les protéines à homéodomaine LIM, facteurs de transcription de la classe Forkhead et ETS (Dou *et coll.*, 1997 ; Lin *et coll.*, 1998 ; Thor *et coll.*, 1999 ; Kania *et coll.*, 2000). Par exemple, dans la moelle épinière ventrale embryonnaire, on distingue 2 types de colonnes innervant les membres (LMC pour lateral motor column). Les MNs localisés dans la LMC<sub>m</sub> (LMC médiale) qui innerve les muscles ventraux des membres expriment la combinaison *Isl1* et *Isl2* tandis que les MNs localisés dans la LMC<sub>l</sub> (LMC latérale) expriment *Isl2* et *Lhx1* (LIM homeobox gene 1 ou *Lim1*).

#### **4.2.3. La spécification des interneurones V2.**

Comme nous l'avons vu dans le sous chapitre précédent, la spécification des interneurones V2 et des MNs s'effectue dans le territoire d'expression de *Nkx6.1*. L'activation de l'expression de facteurs de transcription spécifiques du programme de différenciation des interneurones V2 dans les progéniteurs *Nkx6.1+* nécessite la répression du programme de différenciation de MNs dans ce territoire, par *Irx3*. L'expression ectopique d'*Irx3* dans la partie ventrale du tube neural induit la différenciation des progéniteurs *Nkx6.1+* en interneurones V2 (Briscoe *et coll.*, 2000). Dans les progéniteurs des interneurones V2, *Nkx6.1* induit l'expression de *Lhx3* au cours de leur dernière division cellulaire. L'expression ectopique de *Lhx3* est suffisante pour induire l'expression ectopique de *Chx10* (marqueur post mitotique d'interneurones V2) dans le tube neural (Tanabe *et coll.*, 1998 ; Sharma *et coll.*, 1998 ; William *et coll.*, 2003). Néanmoins, l'expression ectopique d'*Irx3* n'induit pas de modifications dans le patron

d'expression de *Lhx3* dans la partie ventrale de la moelle épinière (Briscoe *et coll.*, 2000). Ces études mettent clairement en évidence le rôle synergique de *Nkx6.1* et d'*Irx3* dans la spécification des interneurones V2.

Plusieurs études ont permis l'identification de nouveaux marqueurs. Ainsi, le gène codant pour le facteur de transcription *GATA2*, est exprimé dans le territoire p2 où naissent les interneurones V2 (Figure 21). En effet, des observations chez l'embryon de souris ont montré que *Gata2* participe à la génération des V2 (Zhou *et coll.*, 2000) et que ces interneurones sont subdivisés en V2a et V2b, caractérisés respectivement par l'expression de *Chx10* et de *Gata3* (Zhou *et coll.*, 2000 ; Karunaratne *et coll.*, 2002 ; Li *et coll.*, 2005).

Les interneurones V2 sont uniques par le fait qu'ils sont subdivisés en deux sous types moléculairement distincts, V2a et V2b, qui sont mélangés dans le même territoire (Karunaratne *et coll.*, 2002). Toutefois, d'autres sous types d'interneurones ventraux sont connus, tels que les interneurones  $V0_D$  et  $V0_V$  qui sont produits et ségrégués dans des territoires distincts mais tous les interneurones  $V0_D$  et  $V0_V$  expriment la même combinaison de facteurs de transcription (Lanuza *et coll.*, 2004).

Récemment, de nouvelles études ont contribué à mieux comprendre les mécanismes de spécification et la dichotomie des interneurones V2. L'étude d'embryons de souris KO *Mash1* a révélé que le gène proneural *Mash1* était impliqué dans la cascade génétique liée à la spécification des interneurones V2 puisque l'inactivation de *Mash1* altère la différenciation des V2 (diminution de l'expression des marqueurs des V2). D'autre part, le gène *FoxN4* qui code pour un facteur de transcription de type Winged helix/forkhead est co-exprimé avec *Mash1*, dans une partie des progéniteurs neuronaux du territoire p2. Des observations chez la souris ont révélé que *FoxN4* participe également à la spécification des V2 car son invalidation induit la perte de l'expression de *Mash1* dans le territoire p2, associée à l'absence de V2b et entraîne une augmentation du nombre de V2a. Des études en contexte de gain de fonction ont également permis de démontrer que l'association *FoxN4/Mash1* joue un rôle clé dans la spécification des V2b. En effet, *FoxN4* seul, est capable d'induire la différenciation des V2a aux dépens des V2b tandis que la co-expression de *FoxN4* et *Mash1* induit la différenciation des V2b aux dépens des V2a (Li *et coll.*, 2005).

Un autre élément important a été apporté par des expériences de gain de fonction chez l'embryon de poulet. Ces expériences ont mis en évidence le rôle important de la

voie TGF $\beta$ /Activine et notamment de Smad3 (effecteur de la voie TGF $\beta$ /Activine) dans la spécification des interneurons ventraux. En effet, l'induction de l'expression ectopique de Smad3 favorise la différenciation des interneurons ventraux aux dépens des motoneurons. Smad3 joue un rôle clé dans la spécification des interneurons V2 en induisant la différenciation des V2a aux dépens des MNs, puisque l'expression de Chx10 est étendue ventralement dans le territoire des MNs (Garcia-Campmany et Marti, 2007).

D'autre part, une autre étude récente effectuée chez l'embryon de souris KO Notch1 a mis en évidence l'importance de la voie Notch dans la spécification des interneurons V2. Cette étude a montré que dans la moelle épinière embryonnaire, l'inactivation de Notch1, induit une augmentation de la différenciation neuronale dans la partie ventrale du tube neural. Cette augmentation de la différenciation est associée à l'augmentation du nombre d'interneurons V0, V1 et V2. De plus, le nombre d'interneurons V2a est augmenté aux dépens des MNs (Yang *et coll.*, 2006).

Par ailleurs, une étude très récente s'est focalisée sur le rôle de la voie Notch au cours de la spécification des interneurons V2. Cette étude a révélé que dans le territoire p2, la différenciation des V2a/V2b serait contrôlée par l'activation de Notch1 par Delta4. L'activation de Notch1 induit l'activation d'une combinaison de facteurs de transcription spécifiques du programme V2b (Gata2, Scl, Gata3) et dans les autres progéniteurs p2 où Notch1 n'est pas activé, une autre combinaison de facteurs de transcription (Lhx3, Chx10) contrôlerait le programme de différenciation des V2a (Peng *et coll.*, 2007).

Ainsi, l'ensemble de ces données montrent que la spécification des interneurons V2 est assez complexe puisqu'elle implique la participation de plusieurs voies de signalisation (Voie SHH, voie Notch, voie TGF $\beta$ /Activine). Bien que ces études ont apportées de nombreux éléments à la compréhension des mécanismes de spécification et de différenciation des interneurons V2, aucun lien entre ces différentes voies de signalisation n'a été établi et le rôle de gènes tels que FoxN4 ou encore Gata2, n'a pas encore été bien défini.

## **5. Rôle de Gata2 au cours de la neurogenèse embryonnaire.**

### **5.1. Généralités.**

Le gène Gata2 code pour un facteur de transcription à 2 doigts de zinc de type C4, d'environ 50kDa et composé de 480 acides aminés. Gata2 appartient à la famille Gata qui comprend 6 membres chez les vertébrés (Gata1, Gata2, Gata3, Gata4, Gata5 et Gata6). Les membres de la famille Gata codent des facteurs de transcription possédant 2 doigts de zinc de type C4 (inclus dans la séquence en acides aminés Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>17/18</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys) reconnaissant la séquence consensus (A/T) GATA (A/G). Les facteurs de transcription GATA sont très conservés entre les différentes espèces, puisqu'on retrouve des protéines GATA chez tous les eucaryotes, du champignon à la plante et des invertébrés aux vertébrés (Pour revue Patient et McGhee, 2002).

Chez les vertébrés, les facteurs de transcription de la famille GATA sont impliqués dans de nombreux processus développementaux complexes tels que la spécification de l'identité cellulaire, le contrôle de la prolifération cellulaire, de la différenciation et de la migration cellulaire. Gata1, Gata2 et Gata3 sont exprimés de manière prédominante dans le système hématopoïétique. De plus, Gata2 et Gata3 sont également exprimés dans le système nerveux. Gata4, Gata5 et Gata6 sont exprimés en dehors du système hématopoïétique, dans le système cardiovasculaire, gastro-intestinal, dans le système urogénital et dans le système nerveux (Pour revue Cantor et Orkin, 2005). Gata6 est aussi exprimé dans certaines régions du cerveau de souris (Kamnasaran et Guha, 2005).

Afin de mieux comprendre le rôle de Gata2 au cours de l'organogenèse dans ces différents systèmes (hématopoïèse et neurogenèse notamment), le gène Gata2 a été invalidé chez la souris. Les souris Gata2<sup>-/-</sup> meurent durant l'embryogenèse à E10.5 (10,5 jours de développement) à cause de sévères défauts d'hématopoïèse, notamment par l'absence de maintien des progéniteurs hématopoïétiques et aussi par un manque de prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et par l'absence de production de mastocytes (Tsai *et coll.*, 1994 ; Tsai *et coll.*, 1997).



## 5.2. Fonction de Gata2 au cours de la neurogenèse.

Au cours du développement embryonnaire du système nerveux, le gène Gata2 est exprimé très tôt dans le tube neural. En effet, chez l'embryon de souris, Gata2 est activé dès E9, dans la partie ventrale de la zone ventriculaire (ZV), dans le cerveau postérieur (transitoirement dans le rhombomère 2 et dans le rhombomère 4). Ces domaines correspondent aux noyaux présomptifs des nerfs crâniens trijumeau (nV) et facial (nVII)/vestibulo-acoustique (nVIII), respectivement. Il est aussi exprimé dans des précurseurs du nerf oculomoteur (nIII), dans la partie ventrale du cerveau moyen et de la moelle épinière, dans le bulbe olfactif et dans le prétegmentum (Bell *et coll.*, 1999 ; Nardelli *et coll.*, 1999 ; Zhou *et coll.*, 2000) (Figure 20-21).

Des études en contexte de perte et de gain de fonction ont démontré que dans la partie ventrale du cerveau postérieur, Gata2 est nécessaire pour induire la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones sérotoninergiques, et cette différenciation implique d'autres facteurs de transcription tels que Phox2b, Gata3, Pet1 et Lmx1b. La différenciation des neurones sérotoninergiques, s'accompagne de la répression de la différenciation des motoneurons viscéraux (Craven *et coll.*, 2004 ; Pattyn *et coll.*, 2004). D'autre part, des expériences de perte et de gain de fonction ont établi que Gata2 est impliqué dans la spécification et la différenciation des neurones noradrénergiques (Tsarovina *et coll.*, 2004 ; Lucas *et coll.*, 2006). En effet, le mécanisme de différenciation des neurones noradrénergiques implique des interactions entre Gata2, Mash1 et Phox2a/Phox2b.

Dans la partie ventrale du tube neural, Gata2 participe à la génération des V2 puisque chez l'embryon de souris Gata2<sup>-/-</sup>, la différenciation des interneurons V2 est très affectée (Zhou *et coll.*, 2000). Cependant, le rôle de Gata2 dans la cascade génétique et moléculaire responsable de la spécification des interneurons V2 est encore mal défini.

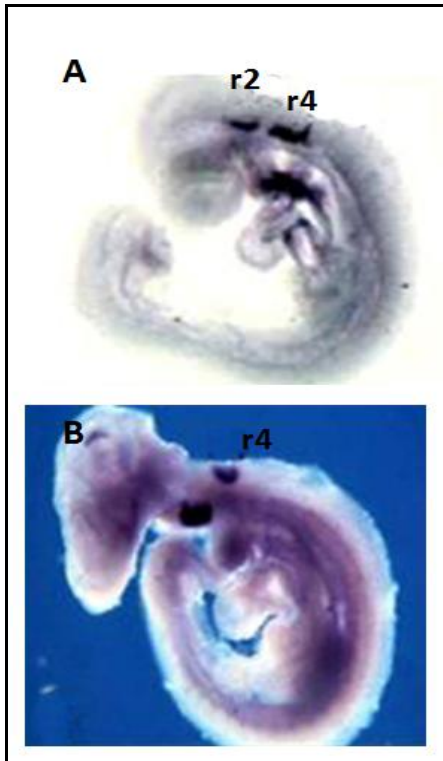


Figure 20| **Patron d'expression du gène Gata2 chez l'embryon de souris.**

Le patron d'expression du gène Gata2 est obtenu par hybridation in situ sur des embryons in toto à E9 (A), à E9.5 (B) et E10.5 (C).

(A) Gata2 est exprimé au niveau du rhombencéphale, r4 et transitoirement dans r2 à E9.

(B) Gata2 est exprimé dans le rhombencéphale r4 et dans la partie ventrale de la moelle épinière à E10.5 (flèche).

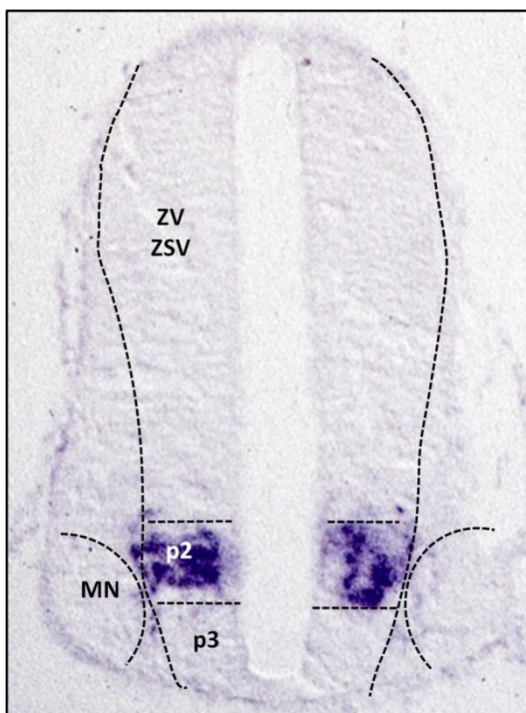


Figure 21| **Expression de Gata2 dans le tube neural.**

Coupe transversale d'un embryon de souris à E10.5 montrant le profil d'expression du gène Gata2 dans la partie ventrale de la moelle épinière, par la technique d'hybridation in situ. Le gène Gata2 est exprimé dans la zone ventriculaire (ZV) et la zone sous ventriculaire (ZSV) dans le territoire p2, qui est adjacent au territoire pMN qui génère les motoneurones (MN).



## 6. Bases du travail de thèse.

Bien que la fonction de Gata2 dans la spécification des neurones sérotoninergiques dans le cerveau postérieur et son rôle au cours de la différenciation des neurones catécholaminergiques du SNP a été établie, dans la moelle épinière sa fonction n'est pas intégralement élucidée.

Dans un tel contexte, les questions que nous avons abordées sont les suivantes :

- ❖ Comment Gata2 est-il activé dans le territoire p2 ?
- ❖ Quelle est la position de Gata2 dans la cascade moléculaire permettant de spécifier les interneurons V2 ?
- ❖ Quelle est la participation de Gata2 dans la dichotomie V2a/V2b ?
- ❖ Quel est le lien entre Gata2 et les voies de signalisation SHH, TGF $\beta$  et Notch ?
- ❖ Quel est le lien entre ces 3 voies de signalisation au cours de la spécification des interneurons V2 ?
- ❖ Quelle peut être l'influence de Gata2 au cours du développement des motoneurons ?
- ❖ Gata2 exerce t-il un contrôle dans les mécanismes de coordination sortie du cycle cellulaire/spécification/différenciation ?

Afin d'apporter des réponses à ces questions concernant le rôle de Gata2 durant la neurogenèse dans la moelle épinière embryonnaire, nous avons étudié sa fonction, à l'aide d'expériences en contexte « perte de fonction » de Gata2, chez l'embryon de souris Gata2<sup>-/-</sup> et en contexte « gain de fonction » pour Gata2, chez l'embryon de poulet.

Nos objectifs sont :

1. Comprendre le rôle de Gata2 au cours de la spécification des interneurons V2.
2. Déterminer le rôle de Gata2 dans le mécanisme de dichotomie des interneurons V2 en V2a/V2b.
3. Comprendre l'influence de Gata2 sur la différenciation des motoneurons.
4. Déterminer la fonction de Gata2 au cours du cycle cellulaire des progéniteurs neuronaux.

Mon travail de thèse a consisté à étudier la fonction du gène Gata2 au cours de la neurogenèse embryonnaire à l'aide d'expériences de gain de fonction chez l'embryon de poulet. Ces expériences ont consisté à électroporer le tube neural in ovo avec un plasmide permettant l'expression ubiquitaire de Gata2. Le choix du modèle poulet présente des avantages très importants

- L'embryon est facilement accessible
- Les expériences de gain de fonction chez l'embryon de poulet permettent d'observer des effets directs induits par la surexpression du gène exogène à des instants précis de la neurogenèse de la moelle épinière embryonnaire. Ceci permet d'éviter d'éventuelles interférences liées aux mécanismes de compensation fonctionnelle qui peuvent se mettre en place au cours du développement.

## **RESULTATS**

---



---

## RESULTATS

### **1. Gata2 contrôle la prolifération des progéniteurs neuronaux.**

#### **1.1. Introduction de l'article.**

Au cours du développement embryonnaire du système nerveux des vertébrés, plusieurs types de cellules neuronales et gliales sont générés à partir des progéniteurs du neuroépithélium, selon une séquence spatio-temporelle rigoureuse et bien définie (Pour revue, Edlund et Jessell, 1999 ; Ohnuma et Harris, 2003 ; Holliday, 2001). L'étape de spécification et de différenciation de ces divers types cellulaires nécessite l'arrêt de la prolifération et la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs. Durant la neurogenèse, la prolifération des progéniteurs neuronaux est principalement régulée par la voie Notch via l'inhibition latérale et la division asymétrique. Ainsi, l'activation de la voie Notch inhibe la neurogenèse et maintient les progéniteurs dans un état prolifératif tandis que son inhibition et l'activation de l'expression des gènes proneuraux tels que Mash1 et Neurogénines (Ngn1-3) induisent la sortie de cycle et la différenciation neuronale (Artavanis-Tsakonas *et coll.*, 1999 ; Farah *et coll.*, 2000 ; Lo *et coll.*, 2002 ; Pour revue, Bertrand *et coll.*, 2002 ; Roegiers et Jan, 2004).

Dans la moelle épinière embryonnaire, le gène Gata2 est exprimé dans la zone ventriculaire, au sein d'une population de progéniteurs neuronaux restreinte, au sein du territoire p2 de spécification des interneurons V2. Par ailleurs, il est impliqué dans les mécanismes de spécification de différents types neuronaux dans le système nerveux, tel les neurones sérotoninergiques dans le rhombencéphale et les neurones catécholaminergiques du système nerveux périphérique (Craven *et coll.*, 2004 ; Tsarovina *et coll.*, 2004 ; Pattyn *et coll.*, 2004).

Durant les étapes précoces de l'hématopoïèse, Gata2 est impliqué dans le contrôle de la prolifération de certains progéniteurs hématopoïétiques et il participe à la spécification de ces progéniteurs (Tsai *et coll.*, 1997 ; Persons *et coll.*, 1999). Bien que la fonction de Gata2 au cours de la spécification des neurones sérotoninergiques et catécholaminergiques du système nerveux périphérique a été bien étudiée (Groves *et*



*coll.*, 1995 ; Tsarovina *et coll.*, 2004 ; Pour revue ; Goridis et Rohrer, 2002), son influence sur le cycle cellulaire des progéniteurs neuraux au cours de la neurogenèse n'a pas été étudiée.

En effet, aucune étude n'a porté sur la fonction de Gata2 au cours de la neurogenèse, en tant que régulateur de la prolifération des progéniteurs neuraux.

Pourtant, plusieurs indices semblent suggérer que Gata2 pourrait avoir une influence sur le cycle cellulaire des progéniteurs neuraux. Premièrement, il est exprimé dans des cellules mitotiques de la moelle épinière embryonnaire, au niveau de la zone ventriculaire où il participerait à la spécification des interneurons V2. Deuxièmement, les données préliminaires de notre groupe montrent que les cellules neuroépithéliales Gata2<sup>-/-</sup> (cellules dérivées de cultures d'explants de tube neural d'embryons de souris Gata2<sup>-/-</sup> à E9.5), présentent un taux de prolifération nettement supérieur à celui des cellules neuroépithéliales sauvages.

L'ensemble de ces données nous a suggéré l'hypothèse selon laquelle, Gata2 exercerait un contrôle sur la prolifération des progéniteurs neuraux. Si Gata2 régule le cycle cellulaire des progéniteurs neuraux, nous pouvons poser les questions suivantes :

- Gata2 interfère-t-il avec la voie Notch ?
- Gata2 est-il capable d'inhiber le cycle cellulaire ?
- À quel niveau du cycle cellulaire s'effectue le contrôle du cycle ?
- Quels sont les régulateurs du cycle cellulaire qui sont modulés par Gata2 ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons entrepris une analyse fonctionnelle de Gata2 en contexte de perte et de gain de fonction. Le contexte de perte de fonction est obtenu chez l'embryon de souris Gata2<sup>-/-</sup>. Si Gata2 inhibe le cycle cellulaire des progéniteurs neuraux, l'absence de Gata2 devrait induire une hyperprolifération qui pourrait conduire à un déficit de différenciation. À l'opposé, le contexte de gain de fonction est obtenu chez l'embryon de poulet, par électroporation du tube neural avec un plasmide permettant l'expression ubiquitaire du gène Gata2, étiqueté avec l'épitope HA (Hémagglutinine). Ce type d'approche en contexte de gain de fonction par électroporation du tube neural d'embryons de poulet présente de nombreux avantages puisque l'embryon de poulet est facilement accessible, il se développe assez rapidement, l'électroporation est unilatérale ce qui permet d'avoir un contrôle interne (seul un côté du tube neural est transfecté) et la surexpression peut être réalisée à différents stades de développement, ce qui permet d'éviter la mise en place de mécanismes de

compensation fonctionnelle. Si Gata2 inhibe le cycle cellulaire, la surexpression de ce dernier devrait induire une diminution voire un arrêt de la prolifération des progéniteurs neuraux, qui pourrait éventuellement aboutir à une différenciation précoce.

Ainsi, nous nous sommes d'abord intéressés, aux composants de la voie Notch (récepteur Notch, Delta1, Jagged1, Hes1 et Hes5). Afin de déterminer les effecteurs du cycle cellulaire qui sont contrôlés par Gata2, nous avons étudié l'expression des régulateurs des différentes phases du cycle cellulaire. Enfin, nous avons également effectué des expériences de complémentation dans des cellules neuroépithéliales de souris Gata2<sup>-/-</sup> en culture.



**1.1. Article.**

**THE GATA2 TRANSCRIPTION FACTOR NEGATIVELY  
REGULATES THE PROLIFERATION OF NEURONAL  
PROGENITORS.**

Development 133, 2155-2165 (2006)



Development 133, 2155-2165 (2006) doi:10.1242/dev.02377

## The GATA2 transcription factor negatively regulates the proliferation of neuronal progenitors

Abeer El Wakil\*, Cédric Francius\*<sup>†</sup>, Annie Wolff, Jocelyne Pleau-Varet<sup>†</sup> and Jeannette Nardelli<sup>†,§</sup>

Postmitotic neurons are produced from a pool of cycling progenitors in an orderly fashion that requires proper spatial and temporal coordination of proliferation, fate determination, differentiation and morphogenesis. This probably relies on complex interplay between mechanisms that control cell cycle, specification and differentiation. In this respect, we have studied the possible implication of GATA2, a transcription factor that is involved in several neuronal specification pathways, in the control of the proliferation of neural progenitors in the embryonic spinal cord. Using gain- and loss-of-function manipulations, we have shown that *Gata2* can drive neural progenitors out of the cycle and, to some extent, into differentiation. This correlates with the control of cyclin D1 transcription and of the expression of the p27/Kip1 protein. Interestingly, this functional aspect is not only associated with silencing of the Notch pathway but also appears to be independent of proneural function. Consistently, GATA2 also controls the proliferation capacity of mouse embryonic neuroepithelial cells in culture. Indeed, *Gata2* inactivation enhances the proliferation rate in these cells. By contrast, GATA2 overexpression is sufficient to force such cells and neuroblastoma cells to stop dividing but not to drive either type of cell into differentiation. Furthermore, a non-cell autonomous effect of *Gata2* expression was observed in vivo as well as in vitro. Hence, our data have provided evidence for the ability of *Gata2* to inhibit the proliferation of neural progenitors, and they further suggest that, in this regard, *Gata2* can operate independently of neuronal differentiation.

**KEY WORDS:** GATA2, Cell cycle, Neuronal progenitors, Posterior neural tube, Mouse, Chick

### INTRODUCTION

The nervous system is a complex tissue including multiple types of neurons organised in elaborate circuits. All neurons are derived from the neuroectoderm and are composed of multipotent proliferating neural progenitors that can individually give rise to both neuronal and glial cell types in a characteristic order of cell differentiation events. This implies that progenitor cell proliferation versus cell cycle exit and differentiation must be precisely coordinated during nervous system development in order to avoid either the depletion of progenitors before the end of histogenesis (Ohnuma et al., 2002) or, conversely, an excess of later-born cell types (Cremisi et al., 2003; Galderisi et al., 2003; Ohnuma and Harris, 2003). Correct coordination between proliferation and differentiation is achieved through different signalling pathways. The most widely implicated pathway in sustaining progenitor proliferation is mediated downstream of Notch receptor activation. This pathway underlies two major mechanisms involved in the choice between maintenance and arrest of proliferation: lateral inhibition and asymmetric division (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Roegiers and Jan, 2004). Upregulation of proneuronal genes, such as *Mash1* (*Ascl1* – Mouse Genome Informatics) or neurogenins, promotes commitment of progenitors to a neuronal fate and cell cycle exit (Bertrand et al., 2002; Blader et al., 1997). Newborn neurons transiently express high levels of either of two types of Notch ligand, delta or jagged (*Dll1* and *Jag1*), which will activate Notch in neighbouring cells and prevent them from differentiating; a phenomenon known as lateral

inhibition of neurogenesis (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). In the case of asymmetric division, only one daughter cell inherits components inhibiting Notch signalling and as a result differentiates, whereas the other daughter cell keeps dividing and remains a precursor (Petersen et al., 2002; Roegiers and Jan, 2004). Other extrinsic and intrinsic cues are believed to govern the progression of a multipotent neural progenitor towards a post-mitotic neuronal precursor state (Edlund and Jessell, 1999). Indeed, crosstalk between Notch signalling and other signalling pathways, acting in specific regions, have been reported (Franco et al., 1999; Hofmann et al., 2004; Tsuda et al., 2002).

Regulatory proteins involved in neuron specification have also been shown to influence the cell cycle (Dubreuil et al., 2000; Edlund and Jessell, 1999; Tanabe et al., 1998). However, data concerning the genetic events, which most probably link specification, modulation of Notch signalling, pro-neural gene trans-activation and the cell cycle machinery, are still limited. Pax6 has been shown to regulate the expression of neurogenin 2 (*Ngn2*; *Neurog2* – Mouse Genome Informatics) in several populations of neuronal precursors in both the brain and the spinal cord (Scardigli et al., 2003), whereas *Mash1* has been placed upstream of genetic cascades leading to the differentiation of serotonergic (Pattyn et al., 2004) and sympathetic (Tsarovina et al., 2004) neurons. In the retina, cyclin D1 and cell cycle inhibitors, such as the p57/Kip2 (*Cdkn1c* – Mouse Genome Informatics) and p27/Kip1 (*Cdkn1b* – Mouse Genome Informatics) proteins, have been shown to be differentially involved in distinct differentiation pathways, suggesting that the expression of cell cycle regulators may be dependent on specification genes (Dyer and Cepko, 2001; Livesey and Cepko, 2001). Deciphering crosstalk between specification genes and the machinery of the cell cycle appears therefore to be a key issue.

Here, we report several lines of data supporting the involvement of GATA2, a transcription factor that contains two C4 zinc fingers, in such crosstalk. GATA2 was first described as a regulatory protein

UMR CNRS 7000, Cytosquelette et Développement, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 105 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France and Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, France.

\*These authors contributed equally to this work

<sup>†</sup>Present address: UMR CNRS 7091 LGN, Bâtiment CERVI, CHU Pitié-Salpêtrière, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

<sup>§</sup>Author for correspondence (e-mail: nardelli@ext.jussieu.fr)

Accepted 27 March 2006

that plays a major role in the proliferation of progenitors and in lineage specification during early hematopoiesis. Indeed *Gata2* loss of function in the mouse leads to the death of embryos between E9.5 and E11, owing to severe defects in primary hematopoiesis (Tsai et al., 1994). *Gata2* also appears to be indispensable for the differentiation of several other tissues during embryogenesis, including the uro-genital (Zhou et al., 1998) and the nervous systems. In the latter case, *Gata2* is known to participate in the differentiation pathway of different types of neurons in the ventral hindbrain and spinal cord, namely cranial nerves (Nardelli et al., 1999; Pata et al., 1999), serotonergic neurons (Craven et al., 2004; Pattyn et al., 2004) and V2 interneurons (Karunaratne et al., 2002; Zhou et al., 2000). The fact that, in each of these lineages, *Gata2* activation is turned on in early precursors raised the possibility that *Gata2* may influence the cell cycle and probably, like other specification genes, participate in its withdrawal. In order to gain further insight into this possible new aspect of *Gata2* function, we carried out analyses aimed at a better understanding of how *Gata2* is linked to the cell cycle. Our data have established that *Gata2* expression is sufficient to force cycling neural progenitors to switch to a quiescent and eventually differentiating state in vivo. In addition, we show that *Gata2* acts as a potent inhibitor of proliferation in embryonic undifferentiated neuroepithelial cells in culture. Such negative control on the proliferation of neuronal progenitors appears to be exerted by *Gata2* by interfering with the regulation of cell cycle components and by shutting off the Notch pathway.

## MATERIALS AND METHODS

### Mouse embryos

Mice heterozygous for the *Gata2*-null mutation (Tsai et al., 1994) were maintained in a mixed C57Bl6/DBA2 background, which was found to slightly improve the survival of the *Gata2*<sup>-/-</sup> embryos in comparison with the pure C57Bl6 background. The day of the vaginal plug was considered to be E0.5 and embryos were collected at E10.5, a stage at which the survival of the homozygous embryos starts to decrease significantly. Only surviving embryos, identified by their beating heart, were included in our studies. Animals and embryos were genotyped as described (Tsai et al., 1994). For BrdU incorporation, pregnant females were injected intraperitoneally (2 g/kg) 1 hour before sacrifice.

### Electroporation of chick embryos in ovo

In order to obtain the pAdRSV-GATA2HA expression plasmid, the entire human sequence encoding *Gata2* was amplified by PCR so as to introduce a *NcoI* site at the 5' end, one copy of the HA epitope and an *EcoRV* site at the 3' end of the cDNA. The PCR product was cloned into PGEM3, entirely checked by sequencing and transferred into pAdRSV-SP (Giudicelli et al., 2001) by *NcoI* and *EcoRV* digestions. The pCAGGS-*Id2* (Dubreuil et al., 2000), pAdRSV-bGal (Giudicelli et al., 2001) and pAdRSVGFp plasmids were kindly provided by Christo Goridis, Pascale Gilardi and Philippe Ravassard, respectively. Fertilised eggs from *Gallus gallus domesticus* hens were incubated at 38°C in a humidified oven. The DNA solution (2-3 mg/ml) was injected in the hindbrain and the spinal cord with an Eppendorf Femtojet injector at stage HH12 or HH15. Six pulses of 25 V for 50 mseconds each were then applied with a BTX ECM 830 electroporator. Embryos were further incubated for either 24 or 48 hours (occasionally for 6-12 hours) before being fixed as described below. For BrdU incorporation, a single injection of a 20 mg/ml BrdU solution was injected into the heart or the umbilical vein 30 minutes prior to collecting the embryos.

### Immunohistology and in situ hybridisation

Embryos, fixed in paraformaldehyde (PFA) 4% for 2-3 hours for immunostaining and overnight for in situ hybridisation, were equilibrated in PBS 30% sucrose, embedded in PBS containing 15% sucrose and 7% gelatin and frozen at -50°C. Serial sections (12 µm) were then cut with a LEICA CM 3000 cryostat.

For immunostaining, sections were saturated with PBS/0.1% Triton/10% foetal calf serum (FCS) (saturation solution) for 30 minutes and incubated with the primary antibody diluted in the same solution. After several washes in PBS/0.1% Triton, the secondary antibody, diluted in the saturation solution, was added for 30 minutes at room temperature. Slides were then mounted in Fluorescent mounting medium (DAKO). Black and white pictures were obtained with a TCS Leica confocal microscope and false-coloured in Photoshop (Adobe).

BrdU staining was performed as described (Ravassard et al., 1997), except that the secondary antibody was coupled to Alexa Fluor 488 or 546. The nuclei were stained with DAPI before mounting. To assess the percentage of *Gata2*-expressing cells being in S phase in E10.5 mouse embryos, BrdU-positive cells were counted among 850 *Gata2*-positive cells, distributed into 10 spinal cord sections from two different E10.5 embryos. In chick embryos misexpressing GATA2-HA, all the nuclei and the BrdU-positive nuclei were counted on the electroporated and the control sides on at least four sections in three different embryos. Counting was carried out using Metamorph software. The same approach was applied to calculate the percentage of phospho-Histone3-positive cells.

TUNEL stainings were performed with the Apodect<sup>plus</sup> kit (Qbiogen) following the supplier's instructions.

In situ hybridisation on sections were performed according to Ravassard et al. (Ravassard et al., 1997). For further immunostaining, sections were processed as described earlier. Staining was analysed with a BX60 Olympus epifluorescence microscope, and pictures were taken with a black and white Cool Snap camera (Ropper Scientific) and false-coloured in Photoshop (Adobe).

### Primary and secondary antibodies

The following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-p27/Kip1 (BD Bioscience, 1/2000), anti-βIII-Tubulin (Babco, 1/10,000), anti-BrdU (DAKO, 1/1000), anti-Isl1 (DSHB; 1/20), 3A10 anti-neurofilament-associated protein (1/500; DSHB), anti-NeuN (Chemicon, 1/1000), rat monoclonal anti-HA epitope (Roche, 1/2000), rabbit polyclonal anti-phospho-Histone3 (Upstate Biotechnology, 1/1000), anti-p57/Kip2 (BD Bioscience, 1/2000), anti-GATA2 (Santa-Cruz, 1/400), anti-GFP (Abcam, 1/1000) and anti-Sox2 (Abcam, 1/1000). The fluorescent secondary antibodies, goat anti-mouse, -rabbit and -rat IgG, all highly absorbed against other species and coupled either to Alexa Fluor 488 or 546 (Molecular Probes) were diluted 1/2000.

### In situ probes

The mouse probes were: *Gata2* (Nardelli et al., 1999); cyclin D1, cyclin D2 and cyclin D3 (Wianny et al., 1998); full-length *p27* cDNA (Toyoshima and Hunter, 1994); 700 bp *Accl/XbaI* fragment for *Sox2*; rat *Notch1* (Lindsell et al., 1996); *Dll1* (Campos et al., 2001); and *Jag1*, full-length *Hes5* cDNA, *Mash1* and *Ngn2* (Gradwohl et al., 1996). The chick probes were: full-length cDNA for *Gata2*; *Sox2*, *Dll1* and *Jag1* (obtained from Nicole Le Douarin's laboratory); *Ngn2* (Novitsch et al., 2001); *Cash1* (Groves et al., 1995); and cyclin D1 (Lobjois et al., 2004). The full chick *Hes5*-coding sequence was cloned by RT-PCR from E6.5 chick retina total RNA, using the following primers: 5'-GCGGCTCGAGAGCCAGCTTCGTGC-3' (forward) and 5'-CCTCTGGAATGTGCACCAGTGTCC-3' (reverse). The cDNA was checked by sequencing. To monitor the activation of cyclin D1 and *Cash1*, antisense probes devoid of bacterial sequence were synthesised from cDNA fragments amplified by PCR. Primers for cyclin D1 amplification were as described (Lobjois et al., 2004); *Cash1* primers were 5'-TGATGCG-CTGCAAGAGGCGG-3' (forward) and 5'-GTAATACGACTCACTAT-AGCACCAGGAAACGTGGTCCAGA-3' (reverse). Likewise, the chick *Id2* probe was synthesised by PCR amplification of the cDNA included in pCAGGS-*Id2*, using the following primers: 5'-AAGCTTTCAGCCCCGT-GCGGT-3' (F) and 5'-GTAAATACGACTCACTATAGAGCGTGGATT-CCTCCCCCTCC-3' (R).

### Cell culture

Mouse embryonic neuroepithelial cell cultures (ENC) were initiated from neural tube explants of E9.5 wild-type and *Gata2*<sup>-/-</sup> embryos, generated in the same genetic background and maintained as described (Nardelli et

al., 2003). All comparative experiments between wild-type and *Gata2*<sup>-/-</sup> cells were performed at matching numbers of passages, which never exceeded 12. To compare the proliferation rate by BrdU incorporation, cells were seeded on glass cover-slips in 24-well plates. At 50% confluency, the cells were placed in medium containing 0.5% FCS. Twenty-four hours later, BrdU (10 µg/ml of culture medium) was added with 10% FCS. The cells were then fixed at different time intervals and treated as previously described for tissue sections. The nuclei were stained with DAPI before the slides were mounted with Dako Fluorescence Mounting Medium. Experiments for each time point were carried out in duplicate, and all experiments were repeated three times. Nuclei were then counted using Metamorph software. Counting was carried out on at least five fields, including more than 200 cells selected on different coverslips. Transfection experiments and immunostaining were performed as described (Nardelli et al., 2003). During GATA2-HA transient expression experiments, BrdU incorporation in transfected and control cells was started 30 hours after transfection and allowed for 15 hours. In situ hybridisation on transfected cells was performed as described (Nardelli et al., 2003). As this protocol does not permit further immunostaining, pAdRSV-βGal plasmid was added to pAdRSV-GATA2HA to detect transfected cells by X-Gal coloration before in situ hybridisation (Nardelli et al., 2003). Control cells were transfected with pAdRSV-βGal alone. The culture medium was changed 6 hours after transfection, replaced by fresh medium and collected 24 hours later. This conditioned medium was diluted twice with fresh medium and applied for 24 hours on *Gata2*<sup>-/-</sup> cells, plated on glass cover-slips in 24-well plates. NB2a neuroblastoma cells were cultured in DMEM supplemented with 10% serum and processed as ENC for immunostaining, transfection and BrdU incorporation.

**Semi-quantitative and quantitative PCR reactions**

Total RNA from wild type or *Gata2*<sup>-/-</sup> embryonic neuroepithelial cells was prepared by adding TRIZOL (Invitrogen) directly onto the cells in the tissue-dish and following the manufacturer's instructions for extraction. RNA was further purified on RNeasy columns (QIAGEN), treated with DNase, then checked and quantified on Agilent chips. Experiments were repeated twice on three different RNA preparations. Quantitative RT-PCR was performed using a SIGMA SYBR Green Quantitative RT-PCR kit.

Reverse-transcription was performed from 5 µg RNA, with Superscript III (Invitrogen). Semi-quantitative PCR was performed with 0.5 µl of reverse-transcription reaction, using FastStart Taq polymerase (Roche). The PCR program included an initial denaturation step of 95°C for 4 minutes, then 45 seconds at 95°C, 45 seconds at 65°C and 30 seconds at 72°C for actin and cyclin D2 (20 cycles), cyclin D1 and Notch1 (23 cycles), cyclin D3 and *p27* (27 cycles), and for cyclin E1 (30 cycles). The PCR products, all sized between 300 and 350 bp, were separated in BET-agarose gels and then analysed with Gel-Doc camera and soft-ware (BioRad) to calculate the relative amount of each product.

The quantitative PCR reactions (20 µl) were performed in a MX 4000 apparatus (Stratagene). The program was as follows: an initial step at 95°C for 10 minutes; 30 seconds at 95°C, 1 minute at 65°C and 30 seconds at 72°C for 36 cycles; then 95°C for 1 minute and a 1°C increment/minute from 55°C up to 95°C to generate denaturation curves.

The primer sequences were as follows: cyclin D1, 5'-TGTTGCC-CTCTGTGCCACAG-3' (forward) and 5'-TCTCGCACGTCGGTGGG-CGT3 (reverse); cyclin E1, 5'-TCAGGAGCAGCAGGGGTCTGC-3' (forward) and 5'-CTGTGGGCTCTGCATCCCA-3' (reverse); *p27*, 5'-TGGAGAGGGGCGAGCTTGCC-3' (forward) and 5'-AGGCCGGG-CTTCTTGGGCGT-3' (reverse); cyclin D2, 5'-TGGCCGCAGTCAGGG-CTCAG-3' (forward) and 5'-TCAGGGCATCACACGTGAGTGTGT-3' (reverse); cyclin D3, 5'-CCTGGCCTTGATTCTGCACCG-3' (forward) and 5'-GCTTCCTGAGGCTCTCCCTG-3' (reverse); actin, 5'-GTGG-GCCGCTTAGGCACCAA-3' (forward) and 5'-CTCTTTGATGTC-ACGCAGATTTC-3' (reverse); Notch1, 5'-CAGTCGTCGACTG-GGGACA-3' (forward) and 5'-TCGTCGGTGTGAGCACCCAC-3' (reverse).

**RESULTS**

***Gata2* expression is predominantly associated with newborn neuronal precursors**

In the hindbrain and the spinal cord, *Gata2* is ventrally expressed in the presumptive domain of V2 interneuron precursors that abut the dorsal limit of the motoneuron domain (Fig. 1A,B) (Briscoe et al., 2000; Karunaratne et al., 2002; Zhou et al., 2000). In the hindbrain, further expression is observed in a thin domain adjacent to the floor-plate corresponding to the p3 domain described in the spinal cord (Fig. 1A) (Briscoe et al., 2000) and generating serotonergic neurons (Craven et al., 2004; Nardelli et al., 1999; Pattyn et al., 2004). For the sake of homogeneity, we principally present data relative to the spinal cord, although our analyses were carried out in both the caudal hindbrain and the spinal cord. As shown in Fig. 1A,B,D, the onset of *Gata2* activation occurs in cells localised in medial and intermediate positions, corresponding to cells either still proliferating or newly withdrawn from division and engaged in the differentiation pathway. Using transgenic mice in which *lacZ* expression was driven by *Gata2* cis-regulating elements, Zhou et al. (Zhou et al., 2000) reported a very restricted overlap between proliferating cells, as evidenced by BrdU incorporation, and β-galactosidase expression in the spinal cord. Using in situ hybridisation we confirmed that, at E10.5, only 9% (75 among 850) of the GATA2-positive cells in the spinal cord appeared to be cycling (Fig. 1C,F). Furthermore, we observed a similarly restricted overlap in all the other sites of *Gata2* expression (data not shown). Such observations, and the fact that *Gata2* has been implicated upstream of several differentiation pathways, raised the hypothesis that *Gata2* could participate in coordinating commitment and cell cycle exit.

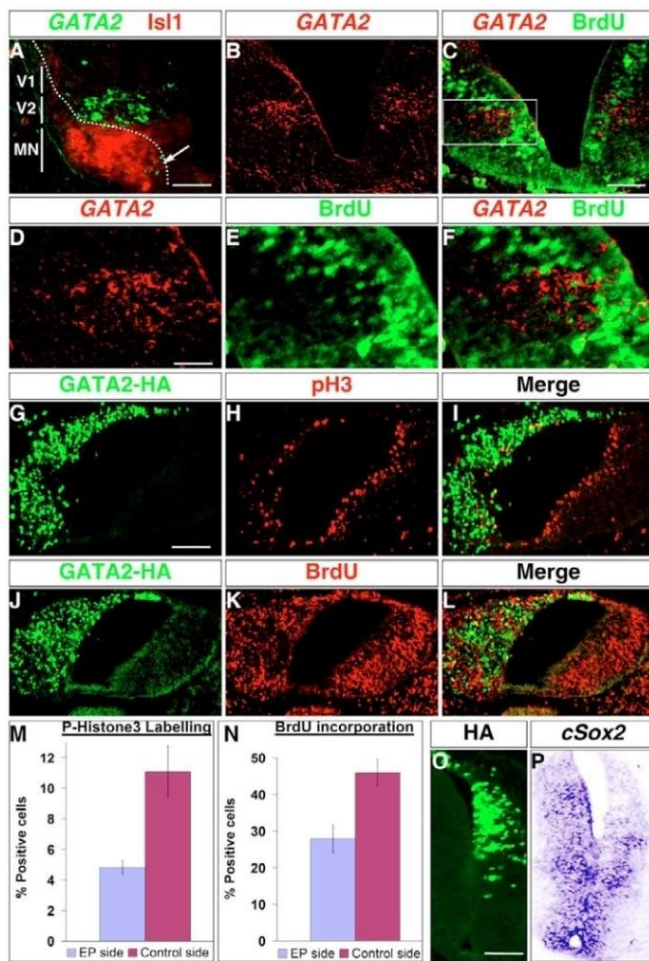
***Gata2* is sufficient to arrest the proliferation of neuronal progenitors in vivo**

To assess the possible role of *Gata2* in the withdrawal of neuronal progenitors from the cell cycle, we first induced *Gata2* misexpression in the neural tube of chick embryos by electroporation of pAdRSV-GATA2HA, a plasmid that drives ubiquitous expression of the human GATA2 protein tagged with the HA epitope. Compared with the non-electroporated side of the neural tube, GATA2-HA expression caused a marked decrease (5% versus 11%) in cells containing phospho-Histone3, a pan-marker of the M phase (Fig. 1G-I,M). Likewise, short pulses of BrdU incorporation, performed for half an hour before collecting the embryos, demonstrated a significant decrease in BrdU-positive cells on the electroporated side (28% compared to 47%) and a very limited coincidence with GATA2-overexpressing cells (Fig. 1J-L,N). In addition, we observed that GATA2-HA caused a marked downregulation of *Sox2*, a pan-marker of the neural progenitor stage (Fig. 1O,P). These results were consistent with the hypothesis that GATA2 can behave as an inhibitor of the cell cycle and may thus actively participate in the switch to the post-mitotic stage in neural progenitors.

**Interaction between *Gata2* and the cell cycle machinery**

To confirm such a role, we investigated possible interactions between *Gata2* and the cell cycle. In most cases, cells leave the cell cycle in G1, when the concentration of cell cycle inhibitors has increased sufficiently to prevent them from reaching the restriction point, thus forcing them to take the G0 branch. These inhibitors principally impair the activity of cyclin-dependent kinases, such as CDK4 and CDK6, which is dependent on interaction with D-type cyclins, namely cyclin D1, D2 and D3 (Cunningham and Roussel,

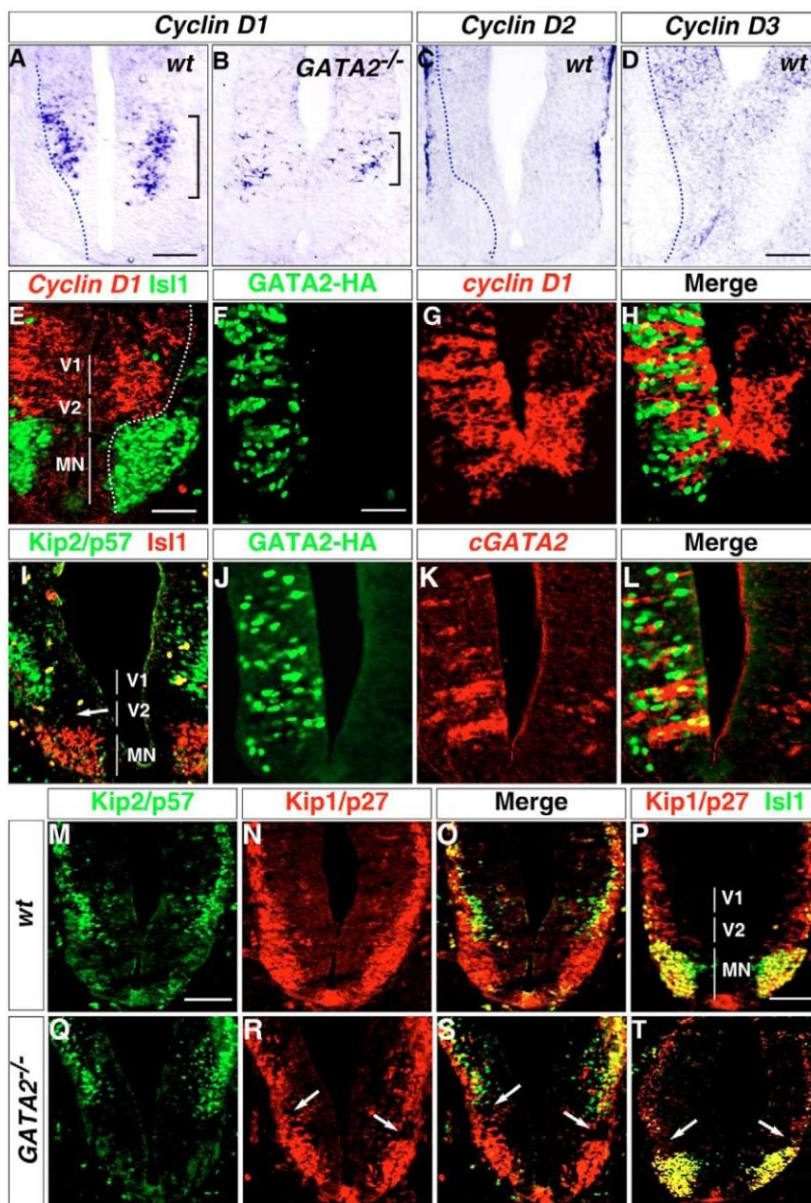




**Fig. 1. GATA2 expression is turned on in newborn progenitors and is sufficient to arrest proliferation.** (A) Transverse section of the caudal hindbrain of a E10.5 mouse embryo, first hybridised with *Gata2* anti-sense RNA (green), then stained with antibodies against Isl1 (red), a pan-marker of motoneurons. The presumptive domain of V2 precursors, which express *Gata2*, is located between the respective domains of the motoneuron and V1 interneuron precursors; in the hindbrain, *Gata2* is also activated to a lesser extent in the p3 domain, indicated by the white arrow. (B,C) Transverse section of the spinal cord of a E10.5 mouse embryo injected with BrdU. Hybridisation with *Gata2* antisense RNA (B) was followed by BrdU immunostaining (C). (D-F) Higher magnification of the area included in the white rectangle in C. (G-L) Transverse sections of the spinal cord of chick embryos 24 hours after electroporation with the pAdRSV-GATA2HA plasmid, double-stained with anti-HA antibodies (G,J) and either with anti-phospho-Histone3 (pH3) (H) or anti-BrdU antibodies (K), and analysed by confocal microscopy. (I,L) Superimpositions of G,H (I) and J,K (L). (M,N) The percentages of phospho-Histone3- and BrdU-positive cells in the control (red, M) and the transfected sides (blue, N) are compared. (O,P) Adjacent sections of chick embryos misexpressing GATA2-HA, stained with anti-HA-antibodies and hybridised with chick *Sox2* anti-sense RNA. Scale bar: in A, 70  $\mu$ m in A-C; in D, 20  $\mu$ m in D-F; in G, 20  $\mu$ m in G-L; in O, 50  $\mu$ m in O,P.

2001; Murray, 2004). However, in addition to their active role during the progression towards the G1/S transition, D-cyclins have also been reported, at high expression levels, to exert the opposite effect and to sustain the maintenance of quiescence (Meyyappan et al., 1998; Pagano et al., 1994). Speculating that *Gata2* could probably affect D-cyclin expression, we first closely examined the distribution of their respective transcripts in the ventral neural tube. At E10.5, surprising distinguishing features were observed in the expression patterns of cyclin D1 and D2. As shown in Fig. 2A,B, cyclin D1 transcripts were detected at low levels (cyclin D1<sup>low</sup>) in the ventricular zone and not at all in the marginal layer, which contains maturing neuron precursors. Strikingly, within the ventricular zone, a high level of expression (cyclin D1<sup>high</sup>) was observed in a domain which abuts the dorsal limit of motoneurons (Fig. 2A,E). This domain most probably includes the presumptive domain of *Gata2*-expressing V2 interneurons and more dorsal interneurons, such as V1. Furthermore, the semi-lateral position of the majority of these cells suggested that this high level of expression was associated with newborn precursors. At the same stage, cyclin D2, like cyclin D1, showed two levels of transcription. In contrast to the general low activation observed in the progenitors, transcripts were conspicuously detected in the marginal layer along the entire dorsoventral axis, although to a lesser extent at the level of motoneurons and more ventral precursors (Fig. 2C). Cyclin D3

expression was restricted to the ventricular zone (Fig. 2D). To summarise, the transcription levels of the three cyclin D genes at E10.5 appeared to vary individually according not only to the phase of the cell cycle, but also to cell specificity. In E10.5 *Gata2*<sup>-/-</sup> embryos, the transcription pattern of neither cyclin D2 nor cyclin D3 seemed to be significantly affected (data not shown). By contrast, we observed a decrease in the number of newborn precursors distinguished by cyclin D1<sup>high</sup> transcription (Fig. 2B). This suggested that *Gata2* might participate in the upregulation of cyclin D1 in newly committed precursors. This hypothesis was further assessed in *Gata2* gain-of-function experiments. Indeed, GATA2-HA misexpression in the spinal cord of chick embryos drove ectopic activation of cyclin D1 (Fig. 2F-H). Surprisingly, such a regulation occurred not only in GATA2-HA-expressing cells but also in neighbouring non-expressing cells (Fig. 2H). Wondering whether this effect was related to the activation of the endogenous *Gata2* gene, we checked its expression in electroporated embryos. Indeed, as in the case of cyclin D1, we observed a clear activation of the endogenous *Gata2* gene not only in GATA2-HA-positive cells, but also in the neighbouring negative cells (Fig. 2J-L). To exclude the possibility that the lack of GATA2-HA detection was due to its degradation, we provided evidence that endogenous chick *Gata2* activation was induced in cells that were not stained by the anti-HA antibody 6 and 12 hours after electroporation (data not shown). In



**Fig. 2. Analysis of the expression of cell cycle regulators in the context of GATA2 loss- and gain-of-function.**

(A-E) transverse sections of the spinal cord of E10.5 mouse embryos, wild type (A,C,D,E) or *Gata2*<sup>-/-</sup> (B); in situ hybridisation was performed with RNA anti-sense probes for cyclin D1 (A,B,E), cyclin D2 (C) and cyclin D3 (D) genes. In E, further staining, performed with anti-islet 1 antibodies (green), shows that the domain of higher concentration of cyclin D1 transcripts abuts the dorsal limit of motoneurons and overlaps V2 and V1 precursors. Broken lines in A,C-E delineate the presumptive limit between the ventricular and the marginal zones. Brackets in A,B indicate the domain where cyclin D1 transcription is upregulated. (F-H,J-L) Transverse sections of the spinal cord of electroporated chick embryos, hybridised with a chick cyclin D1 (G) or *Gata2* (K) antisense RNA probe, then immunostained with anti-HA antibodies (F,I). (H,L) superimposition of E-G (H) and J-K (L). (I,M-T) Confocal analysis of double immunofluorescent staining performed on transverse spinal cord sections of wild-type (I,M-P) or *Gata2*<sup>-/-</sup> (Q-T) E10.5 mouse embryos. Anti-Kip2/p57 antibodies (I,M,Q, green) were coupled with either anti-Is11 (I, red) or anti-Kip1/p27 (N,R). (O,S) Superimpositions of M,N (O) and Q,R (S). (P,T) Double immunostaining with anti-p27 and anti-Is11 antibodies, respectively visualised with anti-mouse IgG1 coupled to Alexa Fluor 546 and anti mouse IgG2b coupled to Alexa Fluor 488. The respective presumptive domains of V1, V2 and motor (MN) neurons are indicated in I and P. White arrows in I indicate that the V2 presumptive domain does not express p57/Kip2, and in R,S,T, that the same domain lacks p27 expression in *Gata2*<sup>-/-</sup> embryos. Scale bar: 70 μm in A-D; 60 μm in E-L; 80 μm in M-T.

conclusion, GATA2 misexpression led to activation of the endogenous *Gata2* and cyclin D1 genes, and some aspects of this activation appears to be generated by a non-cell autonomous process.

To further understand the impact of GATA2 expression on the control of the cell cycle, we next examined the expression of Kip proteins, which are inhibitors of CDK-cyclin D complexes (Cunningham and Roussel, 2001) and markers of the post-mitotic stage in several neuronal differentiation processes (Dyer and Cepko, 2001; Livesey and Cepko, 2001). Although p27/Kip1 protein was continuously expressed in the marginal zone (Fig. 2N,P), thus appearing to be a general marker of post-mitotic precursors in the spinal cord, *p27* transcripts were equally distributed in the neural tube (data not shown). By contrast, p57/Kip2 was barely detected in motor and V2 neuron precursors

(Fig. 2I,M; note the expression gap observed between Is11 and p57 in 2I). Higher expression was observed in more dorsal regions and appeared to precede that of p27 (Fig. 2O). In *Gata2* mutant embryos, p27/Kip1 protein was missing or markedly reduced in a domain dorsally abutting the motoneuron precursors, where *Gata2* is normally expressed (compare Fig. 2O with 2S and Fig. 2P with 2T), whereas the distribution of *p27* transcripts did not seem to be altered (data not shown). Interestingly, expression of p57/Kip2 did not appear to compensate for the lack of p27/Kip1 protein (compare Fig. 2O with 2S) and did not seem to be affected (compare Fig. 2M with 2Q). The ectopic induction of the Kip1/p27 protein we then obtained by *GATA2*-HA misexpression (Fig. 3A-C) further strengthened the hypothesis that GATA2 can participate in the positive control of p27 protein expression and, accordingly, in the engagement towards the post-mitotic stage.

**Gata2 control on cell cycle can be uncoupled from neuronal differentiation**

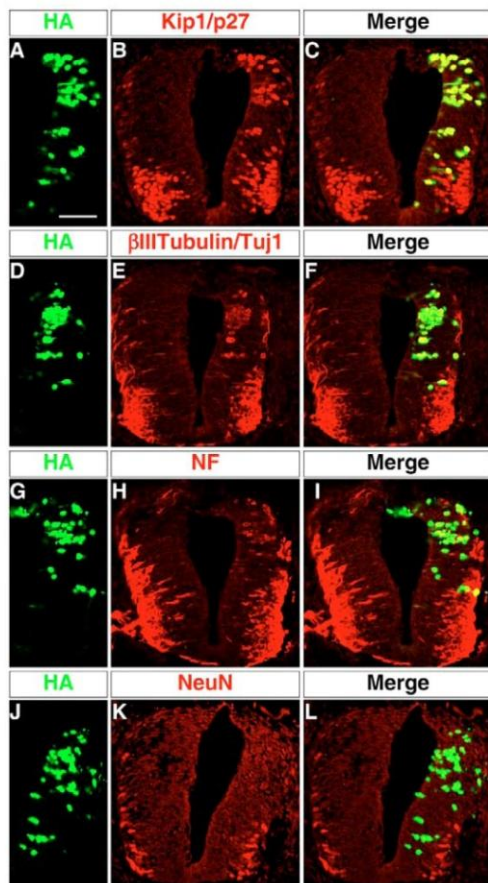
We next wanted to know whether such a role was coupled to neuronal differentiation. Twenty-four hours after electroporation, GATA2-HA misexpression was found to induce the expression of early markers of neuronal differentiation, such as  $\beta$ III-Tubulin/Tuj1 (Fig. 3D-F) and neurofilament (Fig. 3G-I), whereas NeuN expression was not detected (Fig. 3J-L).  $\beta$ III-Tubulin/Tuj1 induction appeared to overlap partially with cyclin D1 activation (see Fig. S1 in the supplementary material). Further analyses carried out 48 hours after electroporation showed that some of the GATA2 misexpressing cells had migrated into the marginal zone. These cells continued to express p27 (Fig. 4A-C),  $\beta$ III-Tubulin/Tuj1 (Fig. 4D-F) and neurofilament (Fig. 4G-I), and had activated NeuN expression (Fig. 4J-L). At this stage, the expression of these markers appeared to be exclusive of that of cyclin D1 (see Fig. S1 in the supplementary material). By contrast, the rest of the GATA2 misexpressing cells had not migrated to the marginal zone, were not dividing (data not shown) and were not expressing

p27/Kip1 (Fig. 4A-C) or neuronal differentiation markers such as  $\beta$ III-Tubulin (Fig. 4D-F), neurofilament (Fig. 4G-I) or NeuN (Fig. 4J-L). GATA2-HA misexpressing precursors thus appeared either to differentiate normally or to become blocked in the ventricular zone and probably unable to progress along the differentiation pathway.

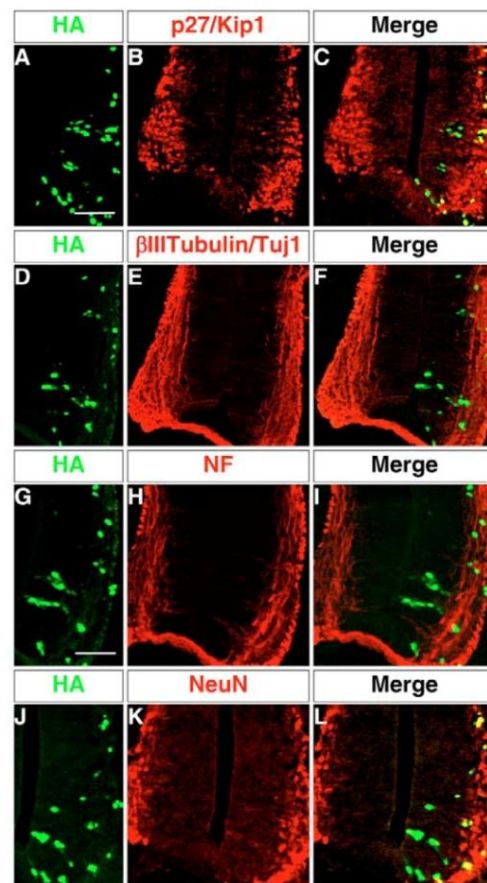
In conclusion, gain-of-function studies established that *Gata2* is sufficient to stop proliferation but not to systematically induce neuronal differentiation. Notably this effect was not regionally restricted along the dorsoventral axis of the neural tube and was therefore independent of the cellular context.

**Gata2 counteracts Notch signalling**

GATA2 capacity to drive cells out of the cell cycle might be achieved through inhibition of the Notch pathway. We therefore analysed the impact of *Gata2* loss- and gain-of-function on the expression of effectors of the Notch pathway such as *Notch1*, *Dll1*, *Hes5*, *Mash1* and *Ngn2*. In this regard, loss-of-function studies did not turn out to be informative as only slight differences could be observed (data not

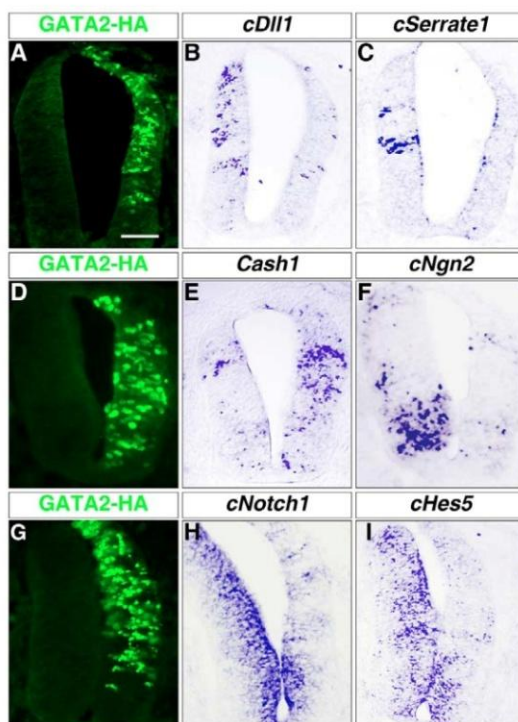


**Fig. 3. GATA2-HA misexpression can induce the expression of postmitotic differentiation markers 24 hours after electroporation.** (A-L) Confocal analysis of adjacent spinal cord sections of a chick embryo misexpressing GATA2-HA 24 hours after electroporation. HA immunostaining (A,D,G,J, green) was coupled with p27/Kip1 (B), Tuj1/ $\beta$ III tubulin (E), neurofilament (NF) (H) or NeuN (K) immunostaining. (C,F,I,L) Superimpositions of A,B (C), D,E (F), G,H (I) and J,K (L). Scale bar: 80  $\mu$ m.



**Fig. 4. Cells misexpressing GATA2-HA can fail to further progress into the differentiation pathway.** (A-L) Confocal analysis of double immunofluorescent stainings performed on adjacent sections of spinal cord of chick embryos 48 hours after electroporation. HA immunostaining (A,D,G,J, green) was coupled with p27/Kip1 (B), Tuj1/ $\beta$ III tubulin (E), neurofilament (NF) (H) or NeuN (K) immunostaining. (C,F,I,L) Superimpositions of A,B (C), D,E (F), G,H (I) and J,K (L). Scale bar: 80  $\mu$ m in A-F; 90  $\mu$ m in G-L.

shown), probably owing to the low distribution of *Gata2*-expressing cells at E10.5. By contrast, gain-of-function studies showed that *Gata2* misexpression caused a clear repression of *Dll1* (Fig. 5A,B), *Ngn2* (Fig. 5D,F), *Notch1* (Fig. 5G,H), *Hes5* (Fig. 5G,I) and even of *Serrate1/Jag1* (Fig. 5A,C), the expression of which does not overlap that of *Gata2*. Only *Cash1*, the chick *Mash1* homologue, appeared to be activated in response to GATA2 misexpression (Fig. 5D,E). Thus, GATA2 appeared to be a strong inhibitor of Notch signalling, which raised the possibility that it could function in concert with proneural activity. To address this question specifically, we decided to analyse the consequences of inhibiting proneural function in the *Gata2* gain-of-function context. To this end GATA2-HA was misexpressed with Id2, a bHLH regulatory protein that has been shown to inhibit the function of proneural proteins. We then observed that GATA2-HA was still able to induce *Cash1* (Fig. 6A,B) activation and chick *Hes5* repression (Fig. 6C,D). Similarly, GATA2-induced neuronal differentiation was not abolished by Id2, as assessed by  $\beta$ III-tubulin expression (data not shown). The sole contrasting effect of Id2 co-expression was the activation of *Ngn2* (Fig. 6E,F). This can be assigned to Id2 function as it was also observed in the presence of Id2 alone (Fig. 6G,J). By contrast, *Cash1* and *Hes5* did not appear to be affected by Id2 misexpression (Fig. 6G-I). These results established that: (1) proneural activity is not required for GATA2 to extinguish Notch signalling and to induce *Mash1* and neuronal differentiation; and (2) Id2 appears to alleviate the repression of *Ngn2* transcription observed in the presence of GATA2 alone.

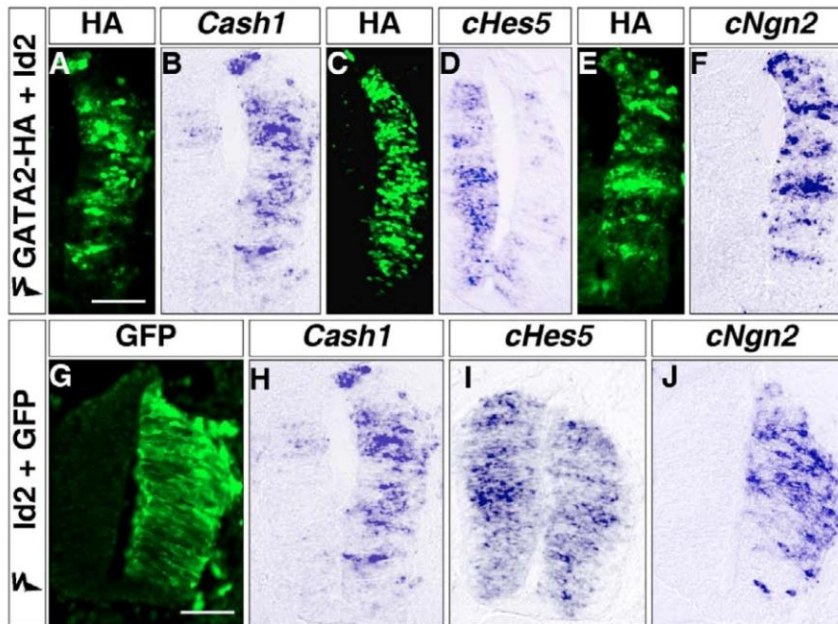


**Fig. 5. The Notch pathway is shut off in the context of *Gata2* misexpression.** (A-I) Spinal cord cross-sections of chick embryos 24 hours after electroporation, hybridised with chick *Dll1* (B), *Serrate1/Jag1* (C), *Cash1* (E), *Ngn2* (F), *Notch1* (H) and *Hes5* (I) antisense RNA probes, or stained with anti-HA antibodies (A,D,G). (B,C,E,F,H,I) Adjacent sections to A,D,G. Scale bar: 70  $\mu$ m.

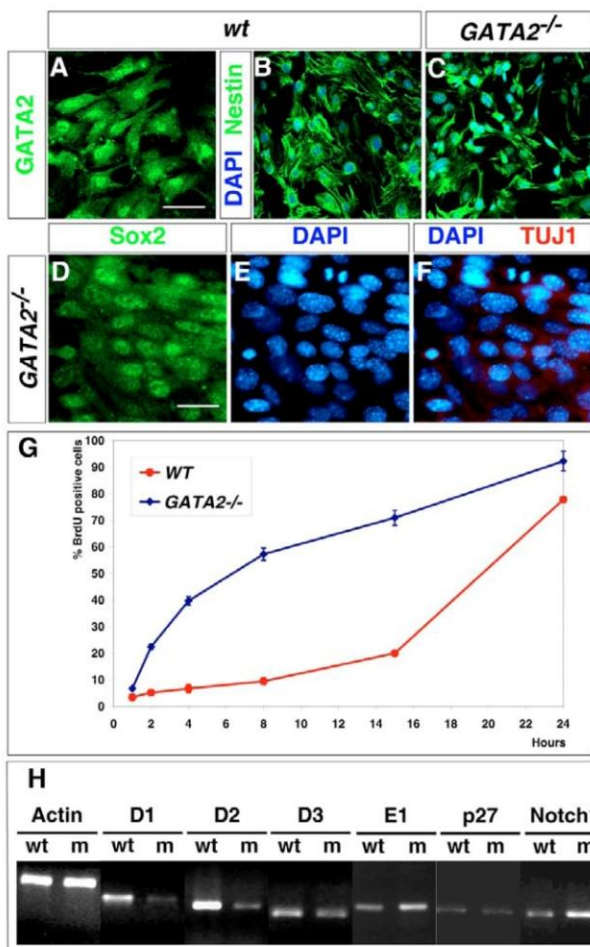
**Gata2 impedes the proliferation of neural cells in culture**

Another consequence that could be expected from defective cell cycle exit in vivo is increased proliferation. However, despite different attempts, it was not possible to provide evidence for such an increase in *Gata2* knockout (KO) embryos. First, the expression pattern of phospho-Histone3 and *Sox2* was found to be unaltered (data not shown). Second, as the *Gata2* RNA probe we had been using allows detection of transcripts generated from both the wild-type and the mutated *Gata2* allele (Tsai et al., 1994), we could assess the distribution of transcripts in both wild-type and *Gata2* KO embryos. We found that the distribution of the transcripts in *Gata2* mutant embryos was in fact more restricted than in wild-type embryos (data not shown). TUNEL staining excluded the possibility that cell death could account for such a difference (data not shown). To further investigate this aspect, we switched our investigations to cultured cells, specifically to mouse embryonic neuroepithelial cells (ENC). Indeed, ENC isolated from either the hindbrain or the spinal cord do express *Gata2* in culture, albeit at low levels [Fig. 7A and Nardelli et al. (Nardelli et al., 2003)]. In addition, these cells exhibit a poor proliferation rate if they do not express an immortalising agent such as a mutated version of SV40T (Nardelli et al., 2003). Speculating that *Gata2* expression could be involved in the restriction of proliferation, we decided to assess the impact of *Gata2* inactivation on the proliferation rate of ENC in culture. To this end, ENC cultures were generated from posterior neural tube explants dissected either from wild-type or *Gata2*<sup>-/-</sup> embryos at E9.5. In accordance with our previous experiments, only 11 out of the 25 wild-type explants survived and could be expanded in culture. The cells derived from these cultures divided very slowly, allowing a passage, at 1:4 dilution, every two to three weeks. By contrast, five out of six cultures originating from *Gata2*<sup>-/-</sup> explants survived, and in all five cases the mutated cells manifested a significantly higher proliferation rate. Indeed, the mutant cells reached confluency in less than a week when seeded at a 1:5 dilution. Moreover, they did not flatten and spread as much as wild-type cells, remaining smaller and more rounded. Widespread nestin (Fig. 7B,C) and Sox2 expression (Fig. 7D and data not shown), and lack of  $\beta$ III-Tubulin expression (Fig. 7F and data not shown) confirmed the neuroepithelial character of the wild-type and mutant cells, and their common low propensity to differentiate.

The marked difference in the proliferation rate between *Gata2* wild-type and mutant ENC was probably due to a shortening of the division time in the absence of GATA2. In order to confirm this, BrdU incorporation was performed in two cultures representative of the wild-type and of the mutant ENC. Both cultures were driven into quiescence by serum deprivation for 24 hours. ENC were allowed to re-enter the cell cycle by addition of foetal calf serum and BrdU in the culture medium, and the rate of BrdU incorporation was compared at time intervals. As shown in Fig. 7G, the percentage of BrdU-positive ENC increased steadily in the mutant cells upon re-entry into the cell cycle. By contrast, such an increase was clearly delayed in the wild-type ENC. Indeed, 60% of the mutant cells, but only 10% of the wild-type cells, were BrdU positive 8 hours after cell cycle reactivation. These results established that the time necessary to reach the G1/S phase was shorter in mutant ENC, thus implying a shortening of the G1 phase in the absence of GATA2. This prompted us to compare the status of cyclin D transcription in wild-type and mutant cells. By performing semi-quantitative RT-PCR, we found that the levels of *cyclin D1* and *cyclin D2* were higher in the wild-type than in the *Gata2*<sup>-/-</sup> ENC, three- and fourfold respectively, whereas no significant differences were observed in the



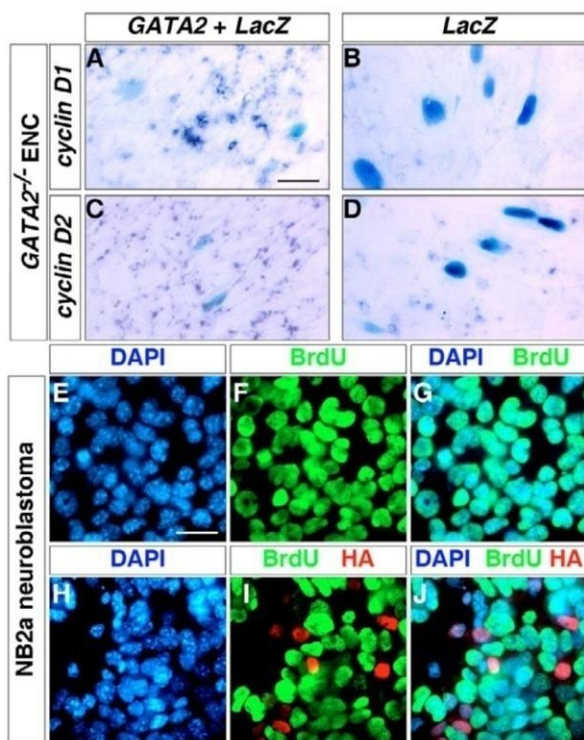
**Fig. 6. *Gata2* function does not require proneural activity.** (A-J) Spinal cord sections of chick embryos 24 hours after electroporation either with pAdRSV-GATA2HA and pACGGScld2 (A-F) or with pACGGScld2 and pAdRSV-GFP (G-J). (A,C,E) Immunostaining with anti-HA antibodies and (G) with anti-GFP antibodies. In situ hybridisation was performed with chick RNA antisense probes for *Cash1* (B,H), *Hes5* (D,I) and *Ngn2* (F,J). (A,B; C,D; E,F; G-J) Adjacent sections. Scale bar: 70  $\mu$ m in A-F; 60  $\mu$ m in G-J.



**Fig. 7. GATA2 inhibits the proliferation of mouse embryonic neuroepithelial cells in culture.** (A-F) Wild-type (A,B) and *Gata2*<sup>-/-</sup> (C-F) embryonic mouse neuroepithelial cells (ENC); immunostaining with anti-GATA2 (A), anti-nestin (B,C, green), anti Sox2 (D, green) and anti-Tuj1/ $\beta$ III-tubulin (F, red) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue) in B,C,E,F. Wild-type (B) or *Gata2*<sup>-/-</sup> (C) ENC express Nestin. Sox2 (D), but no Tuj1/ $\beta$ III-Tubulin (F), can be detected in *Gata2*<sup>-/-</sup> cells, as in wild-type cells (not shown); D-F correspond to the same field. (G) Comparison of the percentage of serum-starved cells reaching the S phase at different time intervals after cell cycle release in the presence of serum and BrdU. (H) Comparison of the transcription level of cyclin D1, cyclin D2, cyclin D3 and cyclin E1, *p27* and *Notch1* genes by semi-quantitative RT-PCR. PCR products were separated on B&E agarose gels, then analysed and quantified with GelDoc camera and software (BioRad). Scale bar: 40  $\mu$ m in A-C; 20  $\mu$ m in D-F.

case of cyclin D3 and of *p27* (Fig. 7H). In addition, the same approach demonstrated that the level of cyclin E1 transcripts was increased by threefold in *Gata2* mutant ENC (Fig. 7H). The results concerning cyclin D1 and cyclin D2 were further confirmed by performing quantitative RT-PCR experiments that showed that the level of transcripts in mutant cells was decreased three- and fivefold, respectively, in comparison with wild-type cells. Consistent with the observations we made in vivo, the concentration of *Notch1* transcripts in wild type ENC cells was found to be 4.5-fold lower than in *Gata2*-deficient ENC.

Consistently, *Gata2* complementation in mutant ENC, achieved by transient transfection with the pAdRSV-GATA2HA construct, appeared to markedly and widely upregulate cyclin D1 and D2 transcription (Fig. 8A,C), which was detected at very low levels in control cells (Fig. 8B,D). Similar upregulation was obtained in non transfected cells cultured in medium conditioned by transfected cells (see Fig. S2 in the supplementary material). These experiments



**Fig. 8. *Gata2*-deficient ENC complemented with *Gata2* exhibit much more active cyclin D1 and cyclin D2 transcription, while *Gata2* transient overexpression blocks the proliferation of mouse neuroblastoma cells.** (A-D) *Gata2*<sup>-/-</sup> ENC were transfected either with pAdRSV-GATA2HA and pAdRSV-βGal plasmids (A, C) or with pAdRSV-βGal alone, then treated for X-Gal colouration and in situ hybridisation with cyclin D1 (A, B) or cyclin D2 (C, D) antisense RNA probes. (E-J) NB2a mouse neuroblastoma cells, either control (E-G) or transiently transfected with pAdRSV-GATA2HA (H-J). BrdU was added in the culture medium 30 hours after transfection, cells were recovered 15 hours later, processed for BrdU staining (F, I) and further HA-immunostained (I, red); nuclei were stained with DAPI (E, H) before mounting. (G, J) Superimpositions of E, F (G) and H, I (J). In the control culture (E-G), cells have not stopped growing and are all BrdU positive; whereas in transfected cultures (H-J), cells have not reached the same density and, especially GATA2-HA expressing cells, have not incorporated BrdU (J). Scale bar: 45 μm in A-D; 15 μm in E-J.

provided evidence that GATA2 induces cyclin D1 and D2 transcription in ENC cells in a non-cell-autonomous manner, as observed for cyclin D1 in vivo. Furthermore, they strongly support that this non-cell-autonomous effect is mediated by a secreted factor. GATA2 transient expression also caused the arrest of the proliferation of *Gata2*<sup>-/-</sup> ENC (see Fig. S3 in the supplementary material) and notably of highly proliferating NB2a mouse neuroblastoma cells. Indeed, in both cases, whereas the control cells continued to grow normally and most of them were BrdU positive (Fig. 8E-G; see Fig. S3 in the supplementary material), transfected cultures did not grow as well, and GATA2-HA expressing cells did not incorporate BrdU or express phospho-Histone 3 (Fig. 8H-J and data not shown). However, this clear inhibition of cell proliferation was not associated with the induction of p27/Kip1 expression or with neuronal differentiation, as deduced by the lack of βIII-Tubulin expression in these cells (data not shown).

## DISCUSSION

*Gata2* has been demonstrated to be a determining factor in molecular cascades that take place during the early steps of several neuronal differentiation pathways (Craven et al., 2004; Karunaratne et al., 2002; Pattyn et al., 2004; Zhou et al., 2000). The fact that only a minority of cells expressing *Gata2* were found to be mitotic raised the possibility that *Gata2* is activated during final cell division prior to differentiation, and this instructs cells to exit the cell cycle in order to engage in terminal differentiation. This has previously been described for other ventral specification genes, such as *MNR2/HB9* during motoneuron specification (Tanabe et al., 1998) or *Phox2b* (Dubreuil et al., 2000). Using both loss- and gain-of-function studies, we have established that *Gata2* exerts negative control on the division of neuronal progenitors, which can lead to cell cycle exit in vivo and restricts the proliferation rate in vitro. Interestingly, this effect was observed both in concert with and independently of neuronal differentiation.

### ***Gata2* is sufficient to inhibit cell proliferation but may require further instruction to induce neuronal differentiation**

As estimated by BrdU incorporation, GATA2 expression can be sufficient to impede the proliferation of neural progenitors, in vivo as in culture, in ENC or NB2a cells. As visualised by p27, βIII-tubulin, neurofilament and NeuN expression, this effect can be further associated with cell cycle exit and neuronal differentiation in vivo. However, if outsets of early neuronal differentiation are primarily observed in GATA2-misexpressing cells in vivo, it appears that part of these cells are not able to keep differentiating properly and become negative for such markers 48 hours after electroporation. Furthermore, no differentiation was observed in culture. Consistently, we suggest that GATA2 may not be always sufficient to consolidate the post-mitotic stage and enable cells to irremediably progress along the differentiation pathway, which may require further molecular events obviously absent in our culture conditions.

### ***Gata2* interferes with the control of expression of components of the cell cycle machinery**

To gain further insight into how GATA2 can eventually participate in cell cycle withdrawal, we focused our studies on D-cyclins and Kip proteins, which are known to play a crucial role during the G1 phase in committing the cells towards either the G0 phase or, conversely, the G1/S transition. According to our expression studies, a low level of activation of the D-cyclins may be sufficient to enable them to participate in the maintenance of cell division, whereas distinct upregulation features appear to be involved in other functions. Indeed, previous reports have shown that high levels of D-cyclins, which can result from either more active gene transcription or further stabilisation of the transcripts, impede cell cycle progression and sustain the maintenance of quiescence (Meyyappan et al., 1998; Pagano et al., 1994). Cyclin D2 transcription pattern is consistent with a general function during the maturation phase of neurons, which could thus be related to consolidation of the postmitotic stage. In addition, it can eventually denote a more specific role, which remains to be understood, during neuronal differentiation. By contrast, the region-specific aspect of cyclin D1 upregulation indicates that environmental cues are implicated in the regulation of this cyclin gene, which is consistent with the fact that growth factors and signalling pathways (Lobjois et al., 2004) have been shown to largely account for distinct expression features of D-cyclins in the early neural plate (Lobjois et al., 2004;

Wianny et al., 1998). Downstream of signalling pathways, specification genes such as *Gata2* may be implicated in the regulation of transcription activation. Further analysis will be necessary to gain more insight into the eventual role of this cyclin during the specification of neural progenitors. With regard to this, we have shown that GATA2 is able to cause transient upregulation of cyclin D1 in vivo and may thus participate in this upregulation in V2 precursors. The same influence of GATA2 on cyclin D1 and D2 transcription has been established in ENC cells. In the case of cyclin D2, this was in discrepancy with the fact that the expression pattern of this cyclin did not seem to be altered in vivo in *Gata2* mutant embryos. This could possibly be explained in a number of ways: (1) the distribution of cells expressing GATA2 at E10.5 and of ventral cells exhibiting the higher level of *cyclin D2* transcription which might be too low to provide clear evidence of altered expression in absence of GATA2; (2) compensatory mechanisms taking place in vivo, as described in KO mice for D-cyclins (Kozar et al., 2004); and (3) the existence of a distinct regulatory mechanism involving *Gata2* and taking place only in culture. The downregulation of cyclin E observed in ENC could be a consequence of the higher expression of cyclin D1 and D2. Indeed, at high concentrations, D-cyclins can inactivate CDK2 by disrupting the complex it forms with cyclin E. This can result in the inhibition of events underlying the progression towards the S phase, in particular the upregulation of cyclin E (Meyyappan et al., 1998; Pagano et al., 1994).

Once cells have been committed to leave the cell cycle, further events may be required to consolidate the post-mitotic stage, such as the expression of p27/Kip1 and/or p57/Kip2 proteins. In fact, p27 continuously delineates the marginal zone, whereas p57/Kip2 is barely detected in the motoneuron and V2 domains. Although the functional consequences of such distinct regional features have not yet been elucidated, they denote the potential existence of different mechanisms underlying cell cycle withdrawal among neural progenitors with respect to their position along the dorsoventral axis. Furthermore, the fact that p27 transcripts were found to be widely distributed in the neural tube supports the idea that the protein synthesis in the marginal layer relies on post-transcriptional controls. Indeed, translational (Kullmann et al., 2002) and post-translational (Tsvetkov et al., 1999; Zhang et al., 2005) events largely account for the control of p27/Kip1 protein expression. Our gain- and loss-of-function analyses strongly support that *Gata2* can contribute to this control in vivo. Furthermore, the lack of p27 protein occurring in GATA2-deficient precursors does not appear to be compensated for by p57/Kip2, and this raises the issue of the alteration of cell cycle exit in these precursors. The expected consequence of such a situation could be increased proliferation. This was overtly manifested by ENC in culture but was not observed in vivo. This failure might be due to the low distribution of cells activating *Gata2* in the ventral spinal cord at E10.5, which was found to be even more restricted in *Gata2* mutant embryos. Considering that cell death could not explain it, this pronounced restriction could be accounted for by two non-mutually exclusive hypotheses: (1) a possible switch in cell fate and the subsequent downregulation of the *Gata2* locus; and (2) the lack of auto-activation potentially induced by GATA2. The latter hypothesis is strongly supported by the fact that exogenous GATA2 expression induced activation of the endogenous *Gata2* and cyclin D1 genes in both a cell-autonomous and non-cell-autonomous manner. Complementation experiments in *Gata2*<sup>-/-</sup> ENC, which confirmed the existence of this non-cell autonomous effect, suggest that endogenous functional *Gata2* is not necessary to mediate this effect, which appears to function in absence of GATA2 and to be mediated by a secreted factor not yet identified. This is also

consistent with the hypothesis that the transcription of cyclin D1 and D2 may not be directly regulated by GATA2. It will be interesting to gain further insight into this transcriptional control and into how this non-cell-autonomous mechanism is controlled in the spinal cord so that *Gata2* activation is restricted to V2 precursors.

### **Gata2 interferes with the Notch pathway**

The Notch silencing caused by *Gata2* gain-of-function manipulations is consistent with the arrest of proliferation and the induction of neuronal differentiation. This effect on the Notch pathway may occur in different ways. First, Notch signalling involves an auto-regulatory loop, which means that alteration of the expression of any component of the loop will alter the expression of other components (Huppert et al., 1997) (for a review, see Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Second, Notch silencing may simply be a consequence of negative regulation of the cell cycle by *Gata2* as interference between Notch signalling and cell cycle components has been reported (Wai et al., 1999). Finally, we cannot rule out that it may rely on degradation processes that control Notch turnover (Oberg et al., 2001; Schweisguth, 1999). Although our data do not allow us to determine the way in which *Gata2* impedes Notch signalling, despite *Cash1* activation, they support the idea that this functional aspect of *Gata2* does not require proneural activity. Indeed, in addition to its proneural activity, *Mash1/Cash1* is involved in neuron-type specification. The two functional aspects have been described to be mechanistically distinct (Parras et al., 2002; Pattyn et al., 2004), and we think that *Cash1* activation by GATA2 is associated with a function in neuronal specification (Craven et al., 2004; Pattyn et al., 2004) and not with proneural activity.

In conclusion, our studies have revealed new aspects of the function of *Gata2* during neurogenesis related to the control of the proliferation of neural progenitors. They provide further evidence of a possible crosstalk between proneural and specification genes that intervene during neuronal fate determination.

We are indebted to Stuart Orkin for providing the *Gata2* mutant mice. We are grateful to Jacques Mallet for his valuable support, to Fabienne Pituello for insightful discussion, to James Briscoe, Gillian Butler-Browne, Racquel Cooper, Françoise Helmbacher, Paula Murphy and Sue Orsoni for critical reading of the manuscript, to Anne Desmazières for her initial participation in the generation of neuroepithelial cell cultures, and to Abiba Doukani for her assistance in quantitative RT-PCR experiments. We thank David Anderson, Jean-François Brunet, Douglas Engel, Johan Ericson, Pascale Gilardi, Christo Goridis, François Guillemot, Tony Hunter, Françoise Lapointe, Robin Lovell-Badge, Jane Johnson, Fabienne Pituello, Philippe Ravassard, Pierre Savatier and Sylvie Schneider-Maunoury for plasmids. This work was supported by CNRS, University Paris VI Pierre et Marie Curie, the AFM and the ARC (grants 5946 and 3376).

### **Supplementary material**

Supplementary material for this article is available at <http://dev.biologists.org/cgi/content/full/133/11/2155/DC1>

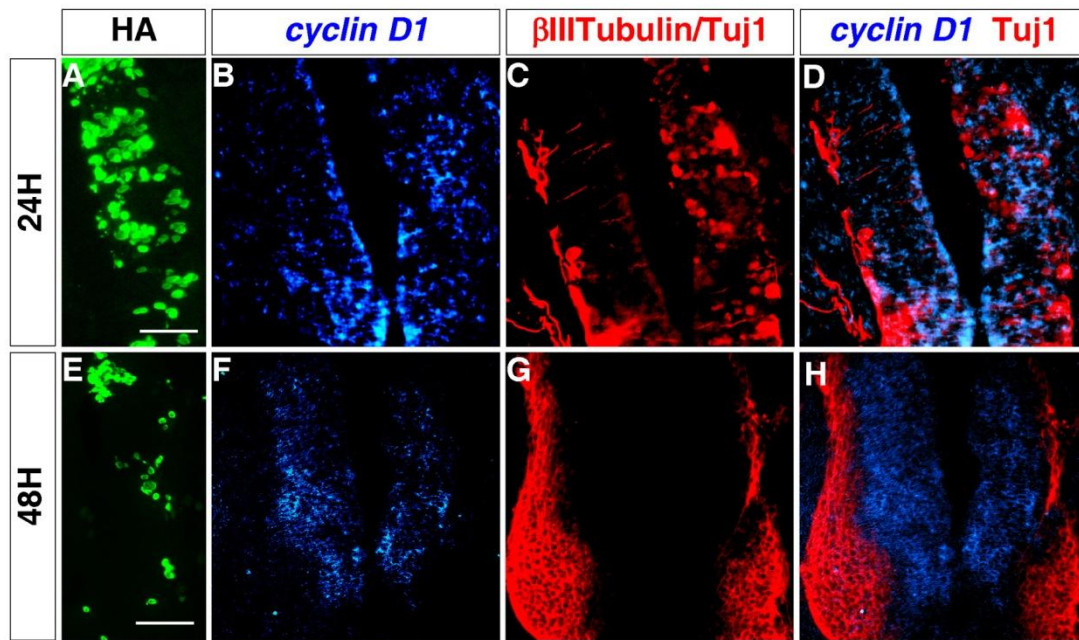
### **References**

- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-776.
- Bertrand, N., Castro, D. S. and Guillemot, F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 517-530.
- Blader, P., Fischer, N., Gradwohl, G., Guillemot, F. and Strahle, U. (1997). The activity of neurogenin1 is controlled by local cues in the zebrafish embryo. *Development* **124**, 4557-4569.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M. and Ericson, J. (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-445.
- Campos, L. S., Duarte, A. J., Branco, T. and Henrique, D. (2001). mDil1 and mDil3 expression in the developing mouse brain: role in the establishment of the early cortex. *J. Neurosci. Res.* **64**, 590-598.
- Craven, S. E., Lim, K. C., Ye, W., Engel, J. D., de Sauvage, F. and Rosenthal, A. (2004). *Gata2* specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog. *Development* **131**, 1165-1173.

- Cremisi, F., Philpott, A. and Ohnuma, S. (2003). Cell cycle and cell fate interactions in neural development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**, 26-33.
- Cunningham, J. J. and Roussel, M. F. (2001). Cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of the central nervous system. *Cell Growth Differ.* **12**, 387-396.
- Dubreuil, V., Hirsch, M. R., Pattyn, A., Brunet, J. F. and Goridis, C. (2000). The Phox2b transcription factor coordinately regulates neuronal cell cycle exit and identity. *Development* **127**, 5191-5201.
- Dyer, M. A. and Cepko, C. L. (2001). p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations. *J. Neurosci.* **21**, 4259-4271.
- Eklund, T. and Jessell, T. M. (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* **96**, 211-224.
- Franco, P. G., Paganelli, A. R., Lopez, S. L. and Carrasco, A. E. (1999). Functional association of retinoic acid and hedgehog signaling in Xenopus primary neurogenesis. *Development* **126**, 4257-4265.
- Galdersi, U., Jori, F. P. and Giordano, A. (2003). Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* **22**, 5208-5219.
- Giudicelli, F., Taillebourg, E., Charnay, P. and Gilardi-Hebenstreit, P. (2001). Krox-20 patterns the hindbrain through both cell-autonomous and non cell-autonomous mechanisms. *Genes Dev.* **15**, 567-580.
- Gradwohl, G., Fode, C. and Guillemot, F. (1996). Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev. Biol.* **180**, 227-241.
- Groves, A. K., George, K. M., Tissier-Seta, J. P., Engel, J. D., Brunet, J. F. and Anderson, D. J. (1995). Differential regulation of transcription factor gene expression and phenotypic markers in developing sympathetic neurons. *Development* **121**, 887-901.
- Hofmann, M., Schuster-Gossler, K., Watabe-Rudolph, M., Aulehla, A., Herrmann, B. G. and Gossler, A. (2004). WNT signaling, in synergy with T/TBX6, controls Notch signaling by regulating Dll1 expression in the presomitic mesoderm of mouse embryos. *Genes Dev.* **18**, 2712-2717.
- Huppert, S. S., Jacobsen, T. L. and Muskavitch, M. A. (1997). Feedback regulation is central to Delta-Notch signalling required for Drosophila wing vein morphogenesis. *Development* **124**, 3283-3291.
- Karunaratne, A., Hargrave, M., Poh, A. and Yamada, T. (2002). GATA proteins identify a novel ventral interneuron subclass in the developing chick spinal cord. *Dev. Biol.* **249**, 30-43.
- Kozar, K., Ciemerych, M. A., Rebel, V. I., Shigematsu, H., Zagodzón, A., Sicinska, E., Geng, Y., Qunyan, Y. Q., Bhattacharya, S., Bronson, R. T. et al. (2004). Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* **118**, 477-491.
- Kullmann, M., Gopfert, U., Siewe, B. and Hengst, L. (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes Dev.* **16**, 3087-3099.
- Lindsell, C. E., Boulter, J., diSibio, G., Gossler, A. and Weinmaster, G. (1996). Expression patterns of Jagged, Delta1, Notch1, Notch2, and Notch3 genes identify ligand-receptor pairs that may function in neural development. *Mol. Cell Neurosci.* **8**, 14-27.
- Livesey, F. J. and Cepko, C. L. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 109-118.
- Lobjois, V., Benazeraf, B., Bertrand, N., Medevielle, F. and Pituello, F. (2004). Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and Shh signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development. *Dev. Biol.* **273**, 195-209.
- Meyyappan, M., Wong, H., Hull, C. and Riabowol, K. T. (1998). Increased expression of cyclin D2 during multiple states of growth arrest in primary and established cells. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3163-3172.
- Murray, A. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**, 221-234.
- Nardelli, J., Thieson, D., Fujiwara, Y., Tsai, F. Y. and Orkin, S. H. (1999). Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev. Biol.* **210**, 305-321.
- Nardelli, J., Catala, M. and Charnay, P. (2003). Establishment of embryonic neuroepithelial cell lines exhibiting an epiplastic expression pattern of region specific markers. *J. Neurosci. Res.* **73**, 737-752.
- Novitsch, B. G., Chen, A. I. and Jessell, T. M. (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* **31**, 773-789.
- Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M. and Lendahl, U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J. Biol. Chem.* **276**, 35847-35853.
- Ohnuma, S. and Harris, W. A. (2003). Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* **40**, 199-208.
- Ohnuma, S., Hopper, S., Wang, K. C., Philpott, A. and Harris, W. A. (2002). Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the Xenopus retina. *Development* **129**, 2435-2446.
- Pagano, M., Theodoras, A. M., Tam, S. W. and Draetta, G. F. (1994). Cyclin D1-mediated inhibition of repair and replicative DNA synthesis in human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**, 1627-1639.
- Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J. and Guillemot, F. (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev.* **16**, 324-338.
- Pata, I., Studer, M., van Doorninck, J. H., Briscoe, J., Kuuse, S., Engel, J. D., Grosveld, F. and Karis, A. (1999). The transcription factor GATA3 is a downstream effector of Hoxb1 specification in rhombomere 4. *Development* **126**, 5523-5531.
- Pattyn, A., Simplicio, N., van Doorninck, J. H., Goridis, C., Guillemot, F. and Brunet, J. F. (2004). Ascl1/Mash1 is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat. Neurosci.* **7**, 589-595.
- Petersen, P. H., Zou, K., Hwang, J. K., Jan, Y. N. and Zhong, W. (2002). Progenitor cell maintenance requires numb and numbl like during mouse neurogenesis. *Nature* **419**, 929-934.
- Ravassard, P., Chatail, F., Mallet, J. and Icard-Liepkalns, C. (1997). Relax, a novel rat bHLH transcriptional regulator transiently expressed in the ventricular proliferating zone of the developing central nervous system. *J. Neurosci. Res.* **48**, 146-158.
- Roegiers, F. and Jan, Y. N. (2004). Asymmetric cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 195-205.
- Scardigli, R., Baumer, N., Gruss, P., Guillemot, F. and Le Roux, I. (2003). Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6. *Development* **130**, 3269-3281.
- Schweigsuth, F. (1999). Dominant-negative mutation in the beta2 and beta6 proteasome subunit genes affect alternative cell fate decisions in the Drosophila sense organ lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11382-11386.
- Tanabe, Y., William, C. and Jessell, T. M. (1998). Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* **95**, 67-80.
- Toyoshima, H. and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74.
- Tsarovina, K., Pattyn, A., Stubbusch, J., Muller, F., van der Wees, J., Schneider, C., Brunet, J. F. and Rohrer, H. (2004). Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development. *Development* **131**, 4775-4786.
- Tsuda, L., Nagaraj, R., Zipursky, S. L. and Banerjee, U. (2002). An EGFR/Ebi/Sno pathway promotes delta expression by inactivating Su(H)/SMRTER repression during inductive notch signaling. *Cell* **110**, 625-637.
- Tsvetkov, L. M., Yeh, K. H., Lee, S. J., Sun, H. and Zhang, H. (1999). p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol.* **9**, 661-664.
- Wai, P., Truong, B. and Bhat, K. M. (1999). Cell division genes promote asymmetric interaction between Numb and Notch in the Drosophila CNS. *Development* **126**, 2759-2770.
- Wianny, F., Real, F. X., Mummery, C. L., Van Rooijen, M., Lahti, J., Samarut, J. and Savatier, P. (1998). G1-phase regulators, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3: up-regulation at gastrulation and dynamic expression during neurulation. *Dev. Dyn.* **212**, 49-62.
- Zhang, W., Bergamaschi, D., Jin, B. and Lu, X. (2005). Posttranslational modifications of p27kip1 determine its binding specificity to different cyclins and cdk5 in vivo. *Blood* **105**, 3691-3698.
- Zhou, Y., Lim, K. C., Onodera, K., Takahashi, S., Ohta, J., Minegishi, N., Tsai, F. Y., Orkin, S. H., Yamamoto, M. and Engel, J. D. (1998). Rescue of the embryonic lethal hematopoietic defect reveals a critical role for GATA-2 in urogenital development. *EMBO J.* **17**, 6689-6700.
- Zhou, Y., Yamamoto, M. and Engel, J. D. (2000). GATA2 is required for the generation of V2 interneurons. *Development* **127**, 3829-3838.

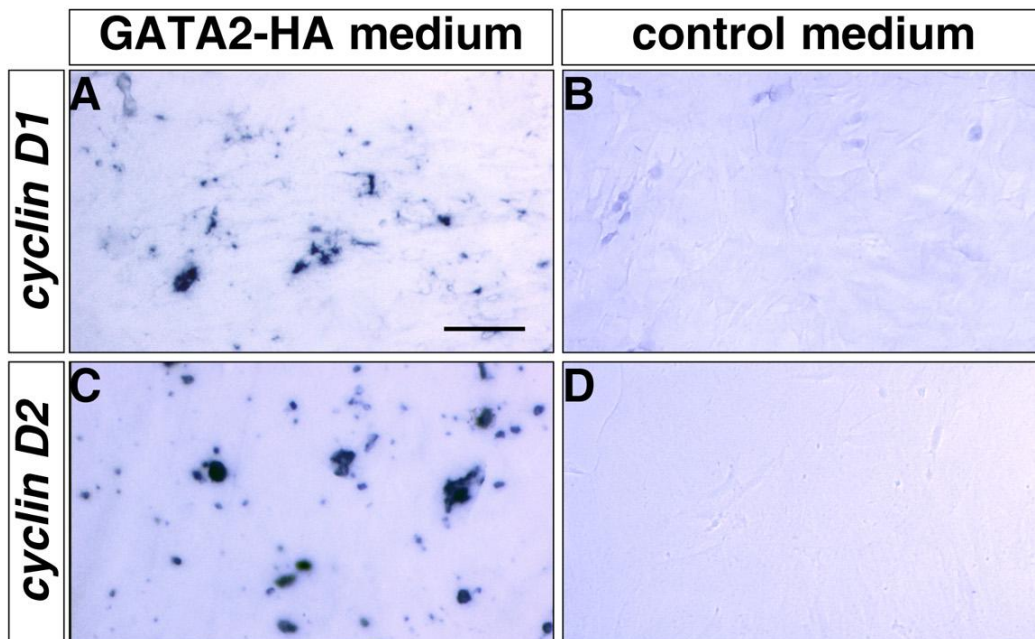






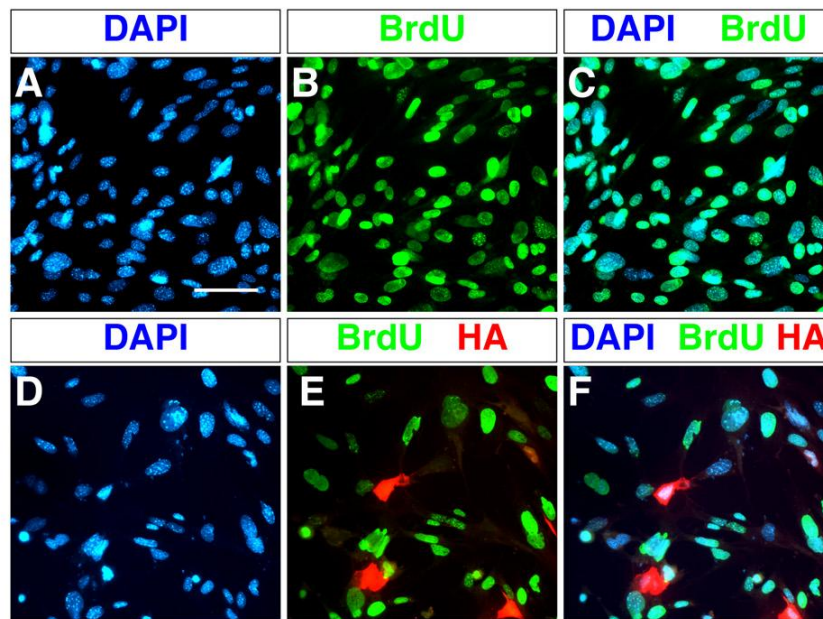
**Supplemental Figure 1S: Comparison of *cyclin D1* and  $\beta$ III Tubulin/Tuj1 expression in chick embryos misexpressing GATA2-HA.**

(A-H), spinal section of a chick embryo collected either 24 hours (A-D) or 48 hours (E-H) after electroporation with the pAdRSV-GATA2HA plasmid. In situ hybridisation was first performed with a *cyclin D1* anti-sense RNA probe (B,F), then further stained with anti-HA (A,E) and anti- $\beta$ III Tubulin/Tuj1 (C,G) antibodies. D and H are superimpositions of B-C and F-G, respectively. Scale bar is 70  $\mu$ m in A-C and 90  $\mu$ m in E-H.



**Supplemental Figure 2S: Non-cell autonomous induction of *cyclin D1* and *-D2* transcription in complemented *GATA2*<sup>-/-</sup> ENC is mediated by a secreted factor.**

**(A-C)** *GATA2*<sup>-/-</sup> ENC were cultured in medium conditioned by the same type of cells previously transfected either with pAdRSVGATA2-HA and pAdRSV- $\beta$ Gal plasmids (A,C), or with pAdRSV- $\beta$ Gal alone (B,D). In situ hybridisations were then performed with RNA anti-sense probes for *cyclin D1* (A,B) or *-D2* (C,D). Scale bar is 45  $\mu$ m in A-D.



**Supplemental Figure 3S: *GATA2* complementation rescues the proliferation defect in *GATA2*<sup>-/-</sup> ENC.**

**(A-F)** BrdU was added in the culture medium of *GATA2*<sup>-/-</sup> ENC, either control (A-C) or transiently transfected with pAdRSV-GATA2HA (D-F), 30 hours after transfection ; cells were recovered 15 hours later, processed for BrdU- (B and E, green) and further HA-immunostaining on transfected cells (F, red); nuclei were stained with DAPI (A, D); (C) and (F), superimpositions of A-B, and D-E, respectively. In the transfected cultures (D-F), cells did not reach the same density than in control cultures (A-C), and *GATA2*-HA expressing cells did not incorporate BrdU (F) . Scale bar is 45  $\mu$ m in A-F.



## 1.2. Synthèse de l'article.

Dans la moelle épinière embryonnaire, le gène Gata2 qui code pour un facteur de transcription à 2 doigts de zinc de type C4 est exprimé par les progéniteurs neuraux dans zone ventriculaire. Alors que Gata2 est impliqué dans le contrôle de la prolifération de certains progéniteurs hématopoïétiques, son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux n'a pas été étudié.

Par des expériences menées en contexte de perte et de gain de fonction, nous avons montré pour la première fois que, Gata2 suffit à lui seul, pour induire l'arrêt de la prolifération des progéniteurs neuraux aussi bien *in vivo*, qu'*in vitro*. D'autre part, Gata2 induit l'expression de p27<sup>Kip1</sup>, un inhibiteur du cycle cellulaire et également la cycline D1, un régulateur de la transition de phase G1/S. De plus, cette inhibition de la prolifération des progéniteurs neuraux s'accompagne de l'inhibition de l'intégralité de la voie Notch.

Par ailleurs, nous avons démontré que Gata2 peut induire successivement, l'arrêt de la prolifération, la sortie de cycle des progéniteurs neuraux et la différenciation neuronale (induction de l'expression du gène proneural Mash1, de la  $\beta_{III}$  tubuline et neurofilament NF-M), mais cette différenciation n'est pas systématique. En effet, l'induction de la différenciation neuronale par Gata2 peut être découplée de la sortie de cycle et ne nécessite pas d'activité proneurale.

Nous avons également mis en évidence que Gata2 exerce la fonction d'inhibiteur du cycle cellulaire dans les cellules neuroépithéliales de souris et dans les cellules de neuroblastome de souris (NB2A), en culture.

Enfin, l'induction de l'arrêt de la prolifération des progéniteurs neuraux par Gata2, présente un caractère cellulaire non autonome, *in vivo*, dans les progéniteurs du tube neural, et *in vitro*, dans les cellules neuroépithéliales de souris en culture.

En résumé, l'ensemble de nos résultats ont permis de mettre en évidence une nouvelle fonction de Gata2. En effet, Gata2 exerce un contrôle négatif et cellulaire-non autonome sur la prolifération des progéniteurs neuronaux *in vivo* et en culture, en induisant un inhibiteur du cycle et en réprimant l'intégralité de la voie Notch. Ce

contrôle peut être découplé de la différenciation neuronale et ne nécessite pas d'activité proneurale.

## 1.3. Discussion.

### 1.3.1. Gata2 inhibe la prolifération cellulaire.

#### 1.3.1.1. *Gata2 inhibe la voie Notch.*

La voie Notch constitue un des principaux mécanismes de contrôle de la prolifération des progéniteurs neuraux. L'activation de ce système de signalisation assure le maintien d'une réserve de progéniteurs nécessaire au bon déroulement de la neurogenèse (Artavanis-Tsakonas *et coll.*, 1999 ; Pour revue, Bertrand *et coll.*, 2002).

Nous avons montré que Gata2 inhibe l'intégralité de la voie Notch en réprimant l'expression des gènes codant pour les ligands (Delta1 et Jagged1), le récepteur Notch1 et un effecteur (Hes5) de cette voie de signalisation. Ainsi, cette inhibition de la phase neurogénique par Gata2, suggère que ce dernier « court-circuite » la voie Notch, probablement par l'induction de la sortie de cycle et de la différenciation neuronale, indépendamment de l'activité proneurale de Mash1. Il serait possible que Gata2 réprime directement ou indirectement l'expression de Notch1. Ainsi, la répression de l'expression de Hes5 serait vraisemblablement liée à la répression de l'expression du récepteur Notch. Nous pouvons penser que Gata2 induirait probablement l'expression de Numb ou Numb-like, dont des études réalisées chez les invertébrés tels que la drosophile, ont mis en évidence la fonction d'inhibiteur de Notch (Frise *et coll.*, 1996 ; Pour revue, Katoh, 2006). L'induction de l'expression de Numb ou de Numb-like, entrainerait la dégradation du récepteur Notch1. Afin de déterminer si Gata2 réprime directement l'expression de Notch1, des expériences de surexpression de protéines de fusion Gata2 dominant répresseur et Gata2 activateur constitutif de la transcription, seraient nécessaires pour déterminer s'ils peuvent aussi participer à cette phase.

En ce qui concerne la répression de l'expression des ligands de Notch tels que Delta1 et Jagged1, nous ne pouvons pas exclure la possibilité pour Gata2 d'induire l'expression d'un autre ligand de Notch tel que Delta3, Delta4 et Jagged2. En effet, notre intérêt s'est porté sur les ligands Delta1 et Jagged1 qui sont exprimés durant la phase



neurogénique, au cours de la neurogenèse. L'étude du patron d'expression des autres ligands de Notch, dans le tube neural est nécessaire.

Néanmoins, nous pouvons suggérer également l'hypothèse selon laquelle, la répression de Delta1 et Jagged1 pourrait être liée en partie, à l'induction de la sortie de cycle et à l'engagement des cellules vers la différenciation. En effet, il peut être envisagé la possibilité que Gata2 régule négativement l'expression des ligands de Notch directement ou indirectement, par l'intermédiaire d'autres partenaires.

### **1.3.1.2. Gata2, un promoteur de la sortie de cycle des progéniteurs neuraux.**

Nos analyses fonctionnelles du gène Gata2 ont démontré que Gata2 suffit à lui seul, pour inhiber la prolifération des progéniteurs neuraux *in vivo* et *in vitro*. Nous avons pu mettre évidence que la plupart des cellules électroporées avec Gata2 sont capables d'induire l'expression de p27<sup>Kip1</sup>, la cycline D1, la  $\beta_{III}$  tubuline et NFM (neurofilament), sans nécessité d'activité proneurale. Ces observations suggèrent que dans la moelle épinière embryonnaire, Cycline D1 pourrait avoir une autre fonction, en plus de régulateur du cycle cellulaire, et en particulier au niveau des programmes de différenciation des interneurons V1 et V2. D'autre part, nous n'avons pas pu analyser l'effet de la surexpression de Gata2 sur d'autres régulateurs du cycle tels que p57<sup>Kip2</sup> et p21<sup>Cip1</sup>, car nous ne disposons pas d'anticorps spécifiques reconnaissant les protéines de poulet p57<sup>Kip2</sup> et p21<sup>Cip1</sup>. Or, des travaux récents ont montré que p21<sup>Cip1</sup> est exprimé uniquement dans les progéniteurs du territoire p2 (Gui *et coll.*, 2007), où est exprimé Gata2. De plus, les CKIs ne semblent pas présenter de redondance fonctionnelle, dans la moelle épinière, ce qui suggère que p27<sup>Kip1</sup>, et surtout p21<sup>Cip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup> qui présentent des patrons d'expression plus limité, auraient des fonctions distinctes, en plus de celle d'inhibiteur du cycle. Elles pourraient ainsi participer aux mécanismes de spécification et de différenciation de certaines populations neuronales (Gui *et coll.*, 2007).

### **1.3.1.3. Gata2, pourrait induire un blocage du cycle cellulaire.**

Une partie des progéniteurs neuraux, électroporés avec le plasmide permettant l'expression ubiquitaire de Gata2 ne semble pas sortir du cycle et entrer en

différenciation. Certaines de ces cellules ne migrent pas vers la zone marginale, 48 heures après électroporation et n'expriment pas de marqueurs de différenciation neuronale tels que  $\beta_{III}$  tubuline et NeuN. Ces observations soulèvent les questions suivantes :

- Que deviennent les cellules électroporées avec Gata2 et qui ne migrent pas ?
- Ces cellules sont-elles sorties du cycle cellulaire ou sont-elles bloquées ?
- Si oui, à quelle phase du cycle cellulaire, peuvent-elles être bloquées ?

Nous avons quelques arguments qui suggèrent que ces cellules seraient vraisemblablement bloquées dans la phase G2 du cycle : elles n'incorporent pas le BrdU (phase S) ; elles n'expriment pas le phospho-Histone3 ou MPM2 (phase M) ; elles ne migrent pas vers la zone marginale et restent dans la zone ventriculaire.

Néanmoins, nous ne savons pas si ces cellules ont conservé une capacité à proliférer et il serait intéressant de valider l'hypothèse du blocage des cellules en phase G2 du cycle cellulaire. Nous pourrions envisager de réaliser des expériences par immunomarquages avec un anticorps spécifique, dirigé contre l'antigène Ki67 (marqueur de cellules mitotiques). Ces marquages permettraient de déterminer si ces cellules ne sont pas sorties du cycle cellulaire. Pour confirmer le niveau de blocage de cellules dans la phase G2, nous pourrions effectuer des immunomarquages à l'aide de marqueurs tels que, les Cyclines A (marqueurs de phase G2) par exemple. Si ces cellules sont bloquées et qu'elles ne migrent pas, plusieurs hypothèses sont envisageables :

- Les cellules bloquées activent leur programme d'apoptose et meurent.
- Les cellules bloquées restent dans un état quiescent, pour une durée indéterminée, mais ne sont pas éliminées.
- Après un temps donné, les cellules bloquées poursuivent leur progression dans le cycle cellulaire, et peuvent proliférer à nouveau ou se différencier.

Le devenir des cellules bloquées pourra être déterminé par des expériences de détection de l'apoptose (TUNEL), par la réalisation d'un traçage de ces cellules au cours du développement. Le traçage des cellules bloquées durant le développement nécessitera l'utilisation d'un système d'expression stable tel que le système de traçage rétroviral de type RCAS-GFP par exemple.

Par ailleurs, nos données ont permis d'établir que la fonction de Gata2 sur l'induction de la sortie de cycle et la différenciation neuronale, ne nécessite pas d'activité

proneurale. Toutefois, il semble que dans les cellules bloquées, Gata2 nécessiterait l'intervention d'informations supplémentaires, qui permettraient la progression vers la phase G0. Ainsi, le contexte cellulaire pourrait avoir un rôle important dans la progression dans le cycle. Il est possible qu'il existe une fenêtre temporelle (phase de cycle) durant laquelle les cellules sont sensibles à l'action de Gata2 et exprimeraient les déterminants nécessaires à Gata2 pour induire la sortie de cycle et la différenciation. En dehors de cette fenêtre temporelle, il serait beaucoup plus difficile d'induire la différenciation neuronale. Une autre hypothèse serait que le niveau d'expression de Gata2 serait déterminant dans la progression de la cellule vers la sortie de cycle et la différenciation. Nous pouvons supposer qu'un niveau très élevé en protéine Gata2 aurait un effet inhibiteur qui provoquerait un blocage systématique des cellules en phase G2. Des niveaux moyens permettraient une induction des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p27<sup>Kip1</sup> et l'expression de gènes liés à la différenciation neuronale tels que le gène proneural Mash1, la  $\beta_{III}$  tubuline et neurofilament NFM. À l'inverse, des niveaux très faibles n'auraient pas d'effets suffisants pour permettre la sortie de cycle et la différenciation neuronale. Néanmoins, nous pouvons exclure l'hypothèse des niveaux très faibles de Gata2, car dans la plupart des cas où les cellules électroporées par Gata2 sont bloquées, on constate que ces cellules présentent un niveau élevé de Gata2 et notamment 48 heures après électroporation.

L'étude de l'effet inhibiteur de Gata2 aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, avec différents vecteurs permettant différents niveaux d'expression en protéine Gata2 devrait permettre de répondre à cette question. Enfin, des analyses biochimiques telles que des expériences par électrophorèses bidimensionnelles ou encore des dosages en protéines Gata2 et également de certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire, par western blot, présenteraient un intérêt pour identifier les déterminants additionnels participant avec Gata2, à la différenciation neuronale.

### **1.3.2. Gata2 peut induire la différenciation neuronale in vivo.**

Les expériences de gain de fonction de Gata2 chez l'embryon de poulet ont clairement mis en évidence la capacité de Gata2 à induire la sortie de cycle et la différenciation neuronale indépendamment de toute activité proneurale. Ces observations nous amènent à poser les questions suivantes :

- Quelle est la signification de l'induction de Mash1 par Gata2 par rapport à l'induction de la différenciation neuronale ?
- Quelle peut être la fonction de la cycline D1, en rapport avec la différenciation neuronale ?

En effet, Gata2 induit l'expression du gène proneural Mash1 qui joue un rôle important dans la spécification et la différenciation de plusieurs types neuronaux. De plus, le tube neural est subdivisé en 5 vésicules dans sa partie antérieure ou rostrale (télencéphale, diencéphale, mésencéphale, métencéphale et myélocéphale) et la moelle épinière dérive de la partie caudale du tube neural. Dans la partie ventrale du télencéphale, Mash1 est impliqué dans la différenciation des neurones GABAergiques alors que dans la partie ventrale du rhombencéphale, il participe avec Gata2, à la différenciation des neurones sérotoninergiques (Craven et *coll.*, 2004 ; Pattyn et *coll.*, 2004). Enfin, dans le locus coeruleus, Mash1 joue un rôle important dans la spécification et la différenciation des neurones catécholaminergiques (Pour revue ; Goridis et Rohrer, 2002).

Nous avons montré que Gata2 induit l'expression de marqueurs précoces de différenciation neuronale ( $\beta_{III}$  tubuline et neurofilament) et également Mash1, mais nous n'avons pas déterminé la contribution de Mash1, dans l'induction de la différenciation neuronale. Enfin nous n'avons pas déterminé si cette différenciation est complète et si elle s'achève par l'émergence d'un type ou de plusieurs types neuronaux.

En effet, dans les conditions normales, Gata2 et Mash1, sont impliqués dans la différenciation de plusieurs types neuronaux en fonction de l'axe antéro-postérieur et l'axe dorso-ventral dans le tube neural, tels que les neurones sérotoninergiques dans la partie ventrale du rhombencéphale. Ces données suggèrent 2 hypothèses :

- La surexpression de Gata2 respecte les spécificités régionales définies le long de l'axe antéro-postérieur (AP) et l'axe dorso-ventral (DV) du tube neural. Dans ce cas, Gata2 induirait la différenciation des neurones sérotoninergiques dans la partie

ventrale du rhombencéphale et des neurones catécholaminergiques dans le locus coeruleus.

- La surexpression de Gata2 induirait probablement la différenciation d'autres types neuronaux, indépendamment du patron d'expression AP et DV.

Afin de déterminer le type ou les différents types neuronaux induits par Gata2, l'analyse de marqueurs spécifiques des différents types neuronaux et de la neurotransmission, tels que TH (enzyme de synthèse de la dopamine) pour les neurones catécholaminergiques, SERT (transporteur vésiculaire de la sérotonine) pour les neurones sérotoninergiques, VGluT2 (transporteur vésiculaire du glutamate) pour les neurones glutamatergiques ou encore GAD67 (enzyme de synthèse du GABA) pour les neurones GABAergiques, dans les cellules électroporées avec Gata2 est nécessaire. Cette analyse devrait également permettre de déterminer si Gata2 est capable d'induire la différenciation neuronale jusqu'au stade terminal.

### **1.3.3. Quelle est la nature du ou des facteurs responsables de l'effet cellulaire non autonome ?**

De manière assez surprenante, Gata2 est capable de médier un effet cellulaire non autonome. Nous avons déterminé que cet effet cellulaire non autonome est médié par un ou plusieurs facteurs extracellulaires diffusibles, sécrétés dans le milieu de culture. La détermination de la nature de ce ou ces facteurs, par des analyses biochimiques peut s'avérer essentielle. En effet, nos données suggèrent que le ou les facteurs responsables de cet effet cellulaire non autonome, ont la capacité d'induire in vivo, non seulement une expression limitée de l'endogène Gata2, mais aussi les mêmes effets que Gata2. Ces facteurs pourraient provoquer l'arrêt de la prolifération, soit en interférant avec les régulateurs du cycle cellulaire, soit par l'intermédiaire de l'activation de l'expression de Gata2.

L'effet cellulaire non autonome est exercé par Gata2, aussi bien in vivo qu'en culture, implique vraisemblablement des facteurs diffusibles de même nature. Des expériences d'implantations de cellules transfectées avec Gata2 et de cellules cultivées dans un milieu contenant ces facteurs, dans la lumière du tube neural d'embryon de poulet pourraient permettre de déterminer si les facteurs induits en culture,

transmettent bien le même effet *in vivo*. D'autre part, nous observons *in vivo*, une expression ectopique de marqueurs de sortie de cycle comme p27<sup>Kip1</sup>, dans des cellules voisines aux cellules électroporées, ce qui suggère que les facteurs à l'origine de l'effet cellulaire non autonome induisent la sortie de cycle et probablement la différenciation *in vivo* de manière directe ou par l'intermédiaire de Gata2, ou de manière indirecte, via d'autres voies de signalisation.

Enfin, il serait intéressant d'explorer de manière plus large, la fonction inhibitrice de Gata2 sur la prolifération, sur des lignées cellulaires à fort taux de prolifération et notamment humaines. Ceci permettrait de déterminer si Gata2 peut être considéré comme un gène anti-tumoral.



## **1.4. Conclusion.**

Nous avons réalisé une étude de la fonction de Gata2 en rapport avec la régulation du cycle cellulaire *in vivo* et *in vitro*, en menant des expériences de perte et de gain de fonction. Ainsi, les résultats que nous avons obtenus ont permis de démontrer que le gène Gata2 est suffisant à lui seul pour induire l'arrêt de la prolifération avec un effet cellulaire non autonome médié par un ou des facteurs diffusibles X. Enfin, Gata2 inhibe la voie de signalisation Notch, et est capable d'induire également la sortie de cycle, puis secondairement, induire la différenciation neuronale indépendamment de toute activité proneurale.

Néanmoins, Gata2 n'induit pas automatiquement la différenciation neuronale, ce qui suggère que le contexte cellulaire peut avoir une importance et deuxièmement, la nature du ou des facteurs diffusibles responsables de l'effet cellulaire non autonome reste à déterminer.





## **2. Rôle de Gata2 dans la spécification des interneurons V2.**

### **2.1. Introduction de l'article.**

Chez les mammifères, la coordination de la locomotion et des mouvements des membres est contrôlée par les circuits locomoteurs. La bonne mise en place des circuits locomoteurs est essentielle pour la fonction de ces réseaux et notamment dans le maintien de la posture. Ces réseaux sont constitués des motoneurons et de 4 classes d'interneurons (inhibiteurs et excitateurs), qui sont localisés dans la corne ventrale de la moelle épinière adulte. Les précurseurs de ces neurones ont été identifiés au cours du développement embryonnaire, et ils sont générés dans la partie ventrale de la moelle épinière embryonnaire, dans des territoires distincts (p0, p1, p2, pMN et p3), identifiés par l'expression d'un programme génétique spécifique lié à leur différenciation (Jessell, 2000 ; Kiehn, 2006 ; Goulding et Pfaff, 2005).

Dans la moelle épinière ventrale embryonnaire, chaque territoire de spécification est défini par l'expression de combinaisons uniques de facteurs de transcription (Briscoe *et coll.*, 1999, 2000). Ces combinaisons sont principalement établies en fonction du gradient de signalisation Sonic Hedgehog et des interactions entre protéines à homéodomaine de classe I et II et en fonction des protéines à domaine bHLH comme Mash1, Olig2 et Ngn2.

D'autre part, les cascades génétiques et moléculaires responsables de la différenciation des motoneurons, des interneurons V0, V1 et V3 ont été élucidées. Concernant les interneurons V2, ils naissent dans le territoire p2, qui est adjacent au territoire de différenciation des motoneurons. Ils sont subdivisés en 2 sous-types, V2a et V2b, caractérisés respectivement par l'expression de Chx10 et Gata3. Des expériences effectuées en contexte de perte et de gain de fonction ont montré que Nkx6.1, Irx3, Mash1, Gata2, Lhx3 et FoxN4 sont impliqués dans la spécification et la différenciation des V2 (Briscoe *et coll.*, 2000 ; Zhou *et coll.*, 2000 ; Karunaratne *et coll.*, 2002 ; Li *et coll.*, 2005). D'autre part, l'activation de la voie TGF $\beta$ /Activine joue un rôle très important dans la différenciation des interneurons ventraux, puisque la surexpression de Smad3 (transducteur de la voie TGF $\beta$ /Activine), induit la différenciation des interneurons

ventraux (notamment celle des V2a), aux dépens de celle des motoneurones (Garcia-Campmany et Marti, 2007). Cependant, l'activation de la voie TGF $\beta$ /Activine sur la différenciation des interneurones V2b n'a pas été étudiée.

Des travaux très récents ont également mis en évidence l'implication de la voie Notch dans la spécification des interneurones V2, car chez l'embryon de souris Notch1<sup>-/-</sup>, la différenciation des motoneurones est altérée au profit des interneurones V2a (Yang *et coll.*, 2006). La voie Notch semble être également impliquée dans la dichotomie des interneurones V2 puisque Delta4 est exprimé dans le territoire p2 où, l'activation de Notch, participe à activation de l'expression de facteurs de transcriptions spécifiques du programme de différenciation des interneurones V2b (Peng *et coll.*, 2007).

Bien que de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la spécification des interneurones V2 aient été identifiés, le rôle de chacun de ces facteurs de transcription et leur ordre d'activation dans la cascade génétique de spécification des interneurones V2 n'est pas entièrement élucidé. Le lien entre les voies Notch et TGF $\beta$ /Activine, et ces facteurs de transcription est encore mal compris. Le rôle de Gata2 et sa position dans cette cascade n'est pas bien définie.

Dans une étude précédente, nous avons déjà mis en évidence le rôle de Gata2 dans l'inhibition de la prolifération des progéniteurs neuronaux, l'induction de la sortie de cycle et la différenciation neuronale (El Wakil *et coll.*, 2006). Afin d'étudier le programme de différenciation neuronale initié par Gata2, dans la moelle épinière embryonnaire, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de spécification et de différenciation des interneurones V2.

L'ensemble des données concernant la spécification des interneurones V2, nous amène à poser les questions suivantes :

- Quels sont les facteurs de transcription responsables de l'activation de l'expression de Gata2 dans le territoire p2 ?
- Quelle est la position des autres gènes impliqués dans la spécification des interneurones V2, par rapport à Gata2 ?
- Gata2, interfère-t-il avec la voie TGF $\beta$ /Activine ?
- Existe-t-il une interférence entre la voie Notch et la voie TGF $\beta$ /Activine ?
- La division asymétrique intervient-elle dans le mécanisme de dichotomie des interneurones V2 ?

- Quel est la nature du système de neurotransmission des interneurones V2 ?
- Gata2, affecte-t-il la différenciation des motoneurones ?

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé une approche génétique, à l'aide d'expériences en contexte de perte et de gain de fonction. Le contexte de gain de fonction a été obtenu par l'utilisation de la technique d'électroporation de la moelle épinière d'embryons de poulet avec différents vecteurs permettant l'expression ubiquitaire de Nkx6.1, Irx3 et Gata2. Nous avons également utilisé des plasmides permettant l'expression des protéines de fusion VP16ΔhGata2HA (protéine Gata2 en fusion avec le domaine transactivateur VP16 du virus herpes simplex de type II) et EnRΔhGata2HA (protéine Gata2 en fusion avec le domaine répresseur EnR de drosophile). Ces 2 facteurs de transcription modifiés étant respectivement activateur constitutif et répresseur dominant négatif. À l'aide d'expériences de surexpression de ces différents facteurs de transcription, nous avons étudié la fonction de Gata2 dans les mécanismes de spécification et de différenciation des interneurones V2 et des motoneurones.



## 2.2. Article.

# **Gata2 acts as a selector of neuronal fate in the embryonic ventral spinal cord.**

Francius Cédric<sup>1</sup>, Planque Nathalie<sup>1,3</sup>, Pléau-Varet Jocelyne<sup>1</sup>, Mallet Jacques<sup>1</sup>, Briscoe James<sup>2</sup> and Nardelli Jeannette<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> UMR CNRS 7091, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière UPMC, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

<sup>2</sup> Developmental Neurobiology, NIMR, Mill Hill, London NW7 1AA, UK

<sup>3</sup> Present address: Institut Jacques Monod, 4 place Jussieu, 75013 Paris, France.

<sup>4</sup> Corresponding author

### **Corresponding address :**

Dr. J. Nardelli

UMR CNRS 7091, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière UPMC, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Phone : (+) 33 1 42 17 75 59

Fax : (+) 33 1 42 17 75

e-mail : nardelli@ext.jussieu.fr

**SUMMARY**

Extensive gain- and loss-of-function studies have provided considerable insight into the molecular events which underlie the dorso-ventral patterning of the embryonic spinal cord. Cross-talks between different signalling pathways result in the development of distinct genetic pathways, whose activation is restricted to a well-delimited territory. Each pathway thus underlies the arising of a particular differentiation program, corresponding to a particular class of neuron. Within the p2 domain of V2 interneuron (IN) precursors, which arises in the ventral spinal cord at the dorsal limit of the motor neuron domain, a further degree of complexity is achieved, through a further subdivision into V2a and V2bIN. Although factors involved in this process have been identified, the activation sequence and the specific role of each of them are not yet completely elucidated. Here we report a functional study of the GATA2 transcription factor, whose function during the development of V2IN is not fully understood and we carried gain and loss-of-function studies to gain further insight into the role of GATA2 during this process. Our data are consistent with the idea that Gata2 participates in the generation of precursors common to V2a and V2bIN, and then hinges their fate to V2bIN. This appears to be achieved through interference with the TGF- $\beta$  pathway, which promotes the V2a fate, and cross-regulatory loops between Gata2 and Nkx6.1, Irx3, Mash1. Furthermore, we provide evidence for the participation of Gata2 in the repression of the motor neuron genetic pathway, presumably by modulation of the Sonic hedgehog pathway.

## **INTRODUCTION**

Understanding how the generation of hundreds of distinct neuron subtypes is spatially and temporally co-ordinated to yield very complex functional circuits during the development of the nervous system, has been a very exciting challenge in developmental biology.

The spinal cord represents one region of the CNS in which remarkable progress has been made in defining the steps involved in the conversion of progenitor cells into specific classes of neurons. Here progenitor cells are distributed into spatially discrete domains, which express a unique combination of genes, principally encoding either homeodomain or bHLH proteins (Briscoe et al. 2000; Jessell, 2000; Novitch et al., 2001; for review, Briscoe and Novitch, 2007). Extensive gain- and loss-of-function studies have provided considerable insight into the molecular events which underlie such patterning. Complex genetic networks, resulting from cross-talk between diverse signalling pathways, have been involved in a precise compartmentalisation of the ventricular zone into five progenitor domains, namely p3, pMN, p2, p1 and p0. These domains give rise either to interneurons (V3, V2, V1 and V0) or to motor neurons (MN) (Briscoe et al., 2000). It has been clearly established i) that the unique genetic expression program activated in each domain is determinant for cell commitment into a specific neuronal differentiation pathway; ii) cross-inhibitory interactions largely contribute to delineate sharp boundaries between these domains; iii) A gradient of Sonic hedgehog signalling plays a fundamental role into the spatio-temporal control of the expression of key effectors in the respective domains (Ericson et al., 1997; Ericson et al., 1995).

Within the p2 domain, a further degree of complexity is achieved. Indeed, two subclasses of interneurons have been shown to arise in this domain, V2a and V2b, respectively identified by the exclusive expression of Chx10 or Gata3 (Zhou et al., 2000,



Karunaratne et al., 2002). The arising of these two subpopulations appears to rely on a very complex network of genetic interactions, some parts of which being still controversial. Several regulatory proteins have been involved as playing a major role in the specification of V2 interneuron precursors and in the subsequent dichotomy in V2a and V2b, such as FoxN4, Mash1, Irx3 and Gata2 (Nardelli et al., 1999; Pata et al., 1999; Li et al., 2005; Peng et al., 2007; ;Yang et al., 2006; Muroyama et al., 2005; Parras et al., 2002). Recent data have brought valuable insight in the respective roles of these factors, but informations on the hierarchy of their initial activation within the genetic pathways are still limited.

Here we report further data on the role of Gata2 during the specification of V2a and V2b neurons. GATA2 is a C4-zinc finger transcription factor, which has been shown to also participate in the specification of other different types of neurons (Pattyn et al., 2004; Craven et al., 2004; Tsarovina et al., 2004). In the spinal cord, its expression is restricted to the level of the p2 domain. Gata2 function has been more tightly linked to the differentiation of V2b than V2a interneurons (Li et al., 2005; Karunaratne et al., 2002). Recently, data provided evidence for Gata2 expression in early V2 common precursors and sustained a possible role of Gata2 upstream of the dichotomy between V2a and V2b (Peng et al., 2007). Indeed, activation of the Notch pathway in a common precursor expressing Gata2/Delta4 has been shown to participate in this divergence and more specifically in the promotion of V2b neurons (Peng, et al., 2007; Yang et al., 2006). This raises the question of whether Gata2 controls the activation of this pathway or not. In addition, activation of Smad3, a key component of the signalling cascade taking place downstream of TGF- $\beta$ /activin receptors, has been shown to induce V2a neurons, whereas its influence on Gata2/Gata3 expression and on the emergence of V2b neurons has not been investigated (Garcia-Campmany and Marti, 2007).

In order to gain further insight into these aspects and to understand how Gata2 eventually interferes with the signalling pathways thus involved during the differentiation of

V2 interneurons, we have performed gain- and -loss-of function studies. Our data not only support the idea that Gata2 participates first in the emergence of precursors common to both V2a and V2b interneurons, and then promotes the differentiation of V2b interneurons at the expense of V2a. Furthermore, we have shown that Gata2 exerts a strong inhibition on the motor neuron pathway, which is probably required prior to V2 differentiation and presumably relies on a modulation of the Sonic hedgehog pathway.



---

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

*Gata2*<sup>+/-</sup> mice (Tsai et al., 1994) were maintained on the B6/D2 background (Black6/DBA2 F1) and the *Mash1*<sup>+/-</sup> mice (Guillemot et al., 1993) on the CD1 background. The studied gene expression patterns did not present any difference between these two genetic backgrounds. Mice were respectively intercrossed to generate *Gata2* and *Mash1* null embryos. Midday of the day of the occurrence of a vaginal plug was considered as E0.5. *Gata2*<sup>-/-</sup> embryos were collected no later than E10.5, because of a dramatic increase in lethality afterwards. Only healthy embryos, with beating hearts were used for further studies as previously described (El Wakil et al., 2006). *Mash1* null embryos were collected at E10.5 and E11.5. Embryos were fixed at least overnight in PFA 4%/NP40 0.2% for in situ hybridisations and 1 to 1,5 hours for immunostainings. They were then cryo-protected and -sectioned as described (El Wakil et al., 2006). Animals were genotyped by PCR, using the primers described in Tsai et al., 1994 for *Gata2* alleles and in Guillemot et al., 1993 for *Mash1* alleles.

### Chick embryos and electroporation constructs.

Chick embryos were electroporated at stage HH15 as described (El Wakil et al., 2006), then further incubated for 24 or 48 hours after electroporation. They were respectively fixed in 4% PFA/NP40 0.2% for 1 to 1,5 hour for immunostainings and at least overnight for in situ hybridisations. They were processed as mouse embryos for cryo-protection and -sectioning. The pAdRSV-*Gata2*HA and pAdRSV-GFP constructs were described previously (El Wakil et al., 2006). To generate the pAdRSV-EnRΔ*Gata2*HA, the human *Gata2* encoding sequence was amplified by PCR amplification, from base 816 to the 3'end, which was fused with the HA epitope sequence. The PCR fragment was subcloned into pCRII TOPO (Invitrogen),

sequenced and transferred into the pAdRSV-EnR plasmid by AvrII/EcoRV digestion. Likewise, the same PCR fragment was inserted into pAdRSV-VP16 to generate pAdRSV-VP16ΔGata2HA. Both pAdRSV-EnR and -VP16 plasmids were kindly provided by Dr. P. Gilardi. The pCAGG-Nkx6.1 and pCAGG-Irx3 plasmids were described in Briscoe et al., 2000.

### **In situ hybridisations and immunostainings.**

12 μm sections were hybridised, with probes labelled either with digoxigenin-UTP (Roche) or DNP-UTP (Vector) and then processed with anti-digoxigenin (Roche, 1/2000) or anti-DNP antibodies (Perkin-Elmer; 1/1000) coupled to alkaline phosphatase, according to the protocol described in Ravassard et al., 1997. Pictures were taken with a DM5000 Leica microscope, equipped with a Leica DMC300fx camera.

Mouse probes were: Chx10, Irx3, (Briscoe et al, 2000); Delta4 (Benedito and Duarte, 2005), Gata2, Gata3 (J. Nardelli et al., 1999), Mash1 (Guillemot et al.).

Chick probes were: Gata2 (El Wakil et al., 2006), Smad3 (Garcia-Campmany and Marti, 2007), Follistatin, Notch1, Patched, Gli2/Gli3 (from N. Le Douarin's laboratory), Nkx6.1 (Sander et al., 2000), Dll4, (Geneservices; Chest714c11). Irx3 and Chx10 probes were isolated by RT-PCR performed with RNAs isolated from whole E3.5 chick embryos and retina collected on E6.5 chick embryos, respectively. Primer sequences are available on request.

Immunostainings were performed on 12 μm-thick sections as described (El Wakil et al., 2006). The first antibodies were: anti-Lhx3 (mouse, DSHB 67.4E12), Isl1/2 (mouse, DSHB 394D5); Lhx1/5 (DSHB, 4F2); Nkx6.1 (rabbit, kind gift of Dr. Ole Madsen, 1/2000 and DSHB F55A10); Gata3 (mouse, Santa-Cruz, 1/400); Olig2 (rabbit; kind gift of Dr. Chuck Stiles; 1/5000); Smad3 (rabbit; Abcam, 1/1000); HA epitope (Rat, Roche, 1/2000); GFP

(rabbit, Abcam, 1/2000). Secondary antibodies, goat anti-mouse, -rabbit, and -rat IgG-, all fully absorbed to avoid cross-reaction, were coupled to Alexa Fluor 488 or 555 (Molecular Probes) and diluted 1 to 2000. Before mounting with Fluomount (Dako), nuclei were stained with DAPI (400 ng/ml in PBS). Double stainings were analysed with a LEICA TCS confocal microscope. Black and white pictures were false-coloured and superposed on Photoshop (Adobe).



## RESULTS

### **Gata2 interferes with the differentiation of both V2a and V2b interneurons.**

V2b and V2a interneurons (IN) emerge in the p2 territory at E10, and are respectively characterised by the exclusive expression of Gata3 (Gata3+) or Chx10 (Chx10+). Although several lines of data strongly sustained that Gata2 was involved in V2bIN development, data consistent with a possible involvement in the emergence of V2aIN were more scarce and controversial (Zhou et al., 2000; Muroyama et al., 2005; Li et al., 2005; Karunaratne et al., 2002). The more recent observation that Gata2 initial activation takes place in early V2IN precursors, common to both V2aIN and V2bIN lineages, made plausible the hypothesis according to which Gata2 can also interfere with the V2aIN pathway (Peng et al., 2007). Consistently with the overall data, two possibilities could then be taken into account: i) Gata2 can participate in the production of a precursor pool common to both population; ii) Gata2 can then play an active role during the divergence of both lineages and could hinge cell fate into V2bIN at the expense of V2aIN.

To gain insight into these issues, we first decided to assess how Gata2 inactivation could affect the development of V2a and V2bIN. We thus compared the respective representation of V2aIN (Chx10+) and V2bIN (Gata3+), in the spinal cord of Gata2 null versus wild type embryos at E10.5. Both populations were detected to a lesser extent in Gata2 null embryos (Fig. 1B, D) versus wild type embryos (Fig. 1A and C). However the representation of Gata3+ cells appeared to be more dramatically affected than that of Chx10+ cells (compare Fig1B to 1D). Furthermore, in contrast to wild embryos, expression of both markers was excluded from the ventricular zone and observed in more marginal positions. (compare Fig. 1B to 1A and 1D to 1C). These results suggested that, in absence of Gata2, i) the pool of V2IN progenitors was prematurely depleted, which was consistent with the participation of Gata2 in the production



of such progenitors; ii) the differentiation of V2aIN was defective, which supported the idea that Gata2 interferes with the V2aIN pathway. The next step was to determine whether Gata2 is sufficient to impose a V2b fate, and conversely, to impede the differentiation of V2aIN. To this end, we misexpressed Gata2 in the spinal cord of chick embryos, by *in ovo* electroporation. We observed a clear induction of V2bIN precursors, as evidenced by the ectopic activation of Gata3 (Fig. 1G-G'') and Lhx1/5 (Fig. 1H-H''), whose expression was also found to be associated with V2bIN and not V2aIN (data not shown), whereas Chx10 (Fig. 1E-E'') and Lhx3 (Fig. 1F-F'') appeared to be clearly repressed.

Altogether these data were consistent with initial participation of Gata2 in the production of common V2a/V2bIN precursors, in which the gene would then exert a selective function by promoting the differentiation of V2bIN. At this point, we decided to provide further insight in the molecular events which take place during this process.

### **Cross-regulatory interactions between Gata2 and Nkx6.1/Irx3.**

We first took into consideration the mechanisms which underlie Gata2 initial activation and we asked whether they could be controlled by genes known to play a major role in the determination of the p2 domain, such as Nkx6.1 and Irx3 (Briscoe et al., 2000; Sander et al., 2000). In order to assess the existence of such interactions, we analysed Gata2 expression in the spinal cord of chick embryos in which either Nkx6.1 or Irx3 misexpression had been induced. pCAGG-Irx3 was used in association with pAdRSV-GFP in order to detect the transfected cells. Both Nkx6.1 (Fig. 2A, B) and Irx3 (data not shown) misexpression caused ectopic Gata2 activation. Furthermore, a higher activation was reached when both genes were co-misexpressed (Fig. 2C and D). Strikingly, this ectopic activation of Gata2 contrasted with that observed for Chx10 in two main aspects: it was not restricted along the ventro-dorsal axis, whereas in the case of Chx10, we could only observe a limited dorsal extension of its

expression; secondly both Nkx6.1 and Irx3 were more efficient in inducing Gata2 than Chx10 (compare Fig. 2B and A'; Fig. 2D and C', and data not shown). In sum, Nkx6.1 and Irx3 appeared to be able to synergistically induce Gata2 expression, independently of the cellular context. Chx10 activation may correspond to a further step of differentiation, probably more difficult to achieve ectopically. The next issue we addressed was whether Gata2 could in turn have an influence on the expression on Nkx6.1 and Irx3. In E10.5 Gata2 null embryos, the expression pattern of both genes did not present significant changes at E10.5 (data not shown). In the context of Gata2 misexpression, we found that endogenous Nkx6.1 was repressed in cells misexpressing Gata2, and more strikingly, that the dorsal limit of expression of the gene could be extended (Fig. 2E-E''). Misexpression the VP16 $\Delta$ GATA2-HA (Fig. 2G-G'') and EnR $\Delta$ GATA2-HA (Fig. 2I-I'') proteins induced repression and activation of Nkx6.1, respectively. Noteworthy, in the later case, activation occurred in cells which did not express the repressive protein (Fig. 2I''). Hence, Gata2 appeared to be able to control Nkx6.1 expression in its genuine domain of expression by activation of a repressive function, whereas its dorsal ectopic expression could result in an antagonistic effect. Interestingly, the later one could be mediated in a non cell-autonomous manner and we cannot say from these results whether both aspects relied on the same repressive activity or not. Like Nkx6.1, Irx3 was found to be repressed by Gata2 (Fig. 2F-F''), but in a different way. Indeed, in the context of VP16 $\Delta$ GATA2-HA (Fig. 2H-H'') and EnR $\Delta$ GATA2-HA (Fig. 2J-J'') misexpression, Irx3 appeared to be respectively activated and repressed, in contrast to Nkx6.1, which suggested a more direct way of regulation.

We next decided to examine whether these interactions could influence further events which take place in the V2aIN and V2bIN pathways.

### **Genetic hierarchy among Nkx6.1, Gata2, Mash1 and Dll4.**

Data reported on Mash1 function during the specification of V2a/V2bIN have been controversial, since they support a participation of Mash1 in the promotion of either the INV2a or the INV2b pathway (Parras et al., 2002; Muroyama et al., 2005; Li et al., 2005; Peng et al., 2007). We previously reported electroporation studies, which established that Gata2 induces a strong ectopic activation of Mash1 in the chick spinal cord (El Wakil et al., 2006). This result inferred a genetic link between Gata2 and Mash1, which could very likely take place during the development of the genetic V2IN pathway. In order to further clarify this issue, we used Mash1 null embryos and determined whether Gata2 activation was affected in absence of Mash1. We observed that the number of Gata2 expressing cells was moderately decreased at E10.5 (compare Fig. 3E to 3A), but much more dramatically at E11.5 (compare Fig. 3G to 3C). In contrast, the pattern of Chx10 did not seem to be affected at either stage (compare Fig. 3F to 3B and 3H to 3D). According to these results, Mash1 is not essential for Gata2 initial activation, but is then involved in the maintenance of the expression of this gene. Altogether the data are consistent with the existence of a cross-regulatory loop between both genes, whereas Chx10 regulation does not seem to depend on Mash1.

In such a context, we were prompted to examine whether Gata2 and Mash1 could interfere in the regulation of the expression of Dll4 (Delta-like 4), a Notch ligand, whose expression was shown to be restricted to the p2 domain in the spinal (Benedito and Duarte, 2005) cord and to play a key role in the initiation of the V2bIN genetic pathway. Indeed, the fact that Mash1 misexpression was shown to cause Dll4 ectopic expression suggested that some aspect of Dll4 activation was controlled by Mash1 (Peng et al., 2007) and could be by Gata2 as well. To further understand the hierarchy between Dll4 and Gata2/Mash1, Dll4 expression was first analysed in E10.5 Gata2 and Mash1 knock out embryos. In both contexts, the expression

pattern appeared to match very closely that observed in control wild type embryos (compare Fig. 3J and K to 3I). We then performed electroporation studies and, as expected, Gata2-HA caused ectopic Dll4 induction (Fig. 4A-A''). Noteworthy, some aspect of this activation appeared to be non cell-autonomous (Fig. 4''). Furthermore, we found that both misexpression of VP16ΔGATA2-HA (Fig. 4B-B'') and EnRΔGATA2-HA (Fig. 4C-C'') caused ectopic expression of Dll4, again partially with a non cell autonomous aspect (Fig. 4B'' and C''). These data suggested that the initial activation of Dll4 does not depend on Gata2 or Mash1, but Gata2 and Mash1 can be involved in the regulation of Dll4 later on during the development of the V2b/V2a genetic pathways.

We next were interested in the identification of the factor responsible for Dll4 initial activation. The first candidate we logically tested was Nkx6.1. Indeed, we found that Nkx6.1 was able to ectopically induce Dll4 in the chick spinal cord (Fig. 4D-D'') with again a non cell-autonomous aspect (Fig. 4D''). We furthermore observed that Cash1 was strongly repressed in this situation (Fig. 4E-E3), which was quite surprising. Indeed, since Nkx6.1 induces Gata2, we would have expected Cash1 activation along with that of Gata2. Furthermore, Gata3 and Chx10 were found to be not activated in this context, even 48 hours after electroporation (data not shown). Our interpretation is that in presence of Nkx6.1, Gata2 is not able activate Mash1 and subsequently Gata3, nor Chx10, which indicates that the maintenance of the co-expression of Nkx6.1 and Gata2 impedes further progression into either V2a or V2b differentiation pathway.

### **Gata2 interferes with the TGF-β pathway.**

The TGF-β pathway has been shown, through Smad3 activation, to promote the differentiation of V2aIN (Garcia-Campmany and Marti, 2007). This raised two questions: i) Does this pathway also promote V2bIN differentiation? ii) Is there any interference of Gata2

with this pathway? To answer the later question, we performed a series of electroporation studies. We first observed that Gata2 misexpression induced clear repression of Smad3 expression (Fig. 5A-A''). Furthermore, VP16 $\Delta$ GATA2-HA and EnR $\Delta$ GATA2-HA proteins were found to cause respectively activation (Fig. 5B-B'') and repression of Smad3 (Fig. 5C-C''). However, in both cases, some aspects of the effect appeared to be non cell-autonomous (Fig. 5B'' and C''). The ability of Gata2 to control the expression of Smad3 could be mediated by secreted factors which are known to interfere with the TGF- $\beta$  pathway. Such factors have been well characterised (Massague et al., 2005) and among those known to play a role in the developing neural tube are Chordin (Streit et al., 1998), Follistatin (Hemmati-Brivanlou et al., 1994) and Noggin (Smith et al., 1995). We took into consideration the three factors and determined whether their expression was modified in the context of Gata2 misexpression. Only Follistatin, which is expressed at low levels in the spinal cord, except in the most ventral regions, appeared to be clearly induced by Gata2, whereas the other two were not (Fig. 5D-D''). Again, Follistatin activation was observed in cells which did not express exogenous protein, consistently with the occurrence of a non cell-autonomous mechanism. Strikingly, both VP16 $\Delta$ GATA2-HA (Fig. 5E-E'') and EnR $\Delta$ GATA2-HA (Fig. 5F-F'') misexpression caused Follistatin ectopic activation. Thus Follistatin induction could be involved in the control of the TGF- $\beta$  pathway by Gata2. Although these results did not allow to understand how the cell non-autonomous control is mediated by Gata2, but they suggested this could presumably be achieved by modulation of the TGF- $\beta$  pathway.

### **Gata2 inhibits the differentiation of motor neurons.**

Cross-talks between the genetic pathways activated in juxtaposed progenitor domains have largely been involved in the establishment of well-defined boundaries between these domains in the embryonic spinal cord (Jessell, 2000; Briscoe et al., 2000; Novitch et al.,

2001). With respect to the boundary between the p2 and pMN (motor neuron) domains, it was established that cross-repressive interactions between *Irx3* and *Olig2* largely participated in its establishment (Novitsch et al., 2001; Briscoe et al., 2000). We asked whether *Gata2* could also participate in this process.

At first, electroporation studies established that *Gata2* misexpression impeded the differentiation of the motor neurons, as assessed by checking the expression of *Olig2* (Fig. 6A-A''), *Isl1* (Fig. 6B-B'') and *MNR2* (data not shown). We then performed such studies with the VP16Δ*GATA2*-HA and EnRΔ*GATA2*-HA proteins. Inhibition of the motor neuron pathway was caused by the two VP16Δ*GATA2*-HA and EnRΔ*GATA2*-HA proteins, but in the later context, motor neuron were contrastingly induced dorsally (Fig. 6D-D''). These opposite effects suggested that *Gata2* could interfere with the dorso-ventral patterning, in a manner which was dependent on the cellular context. This strongly suggested that *Gata2* could exert a control on the *Shh* pathway.

To confirm this hypothesis, we analysed the effect of *Gata2* misexpression on the expression pattern of *Gli2* and *Gli3*, two genes which play a major role downstream of *Shh* during the dorso-ventral patterning of the spinal cord (Persson et al., 2002; Meyer and Roelink, 2003; Matisse et al., 1998; Stamatakis et al., 2005). We found that *Gli3* was exclusively repressed by the *GATA2*-HA protein (Fig. 6E-E' and 6F-F''), respectively), whereas *Gli2* appeared to be repressed dorsalwards from the motor neuron domain and furthermore activated in this domain. In addition, they were both induced by VP16Δ*GATA2*-HA (Fig. 6G-G' and 6H-H'') and conversely repressed by EnRΔ*GATA2*-HA (Fig. 6I-I' and 6J-J''). This indicated that the dominant aspect of these proteins could make them equally function independently of cell context, in contrast to *Gata2*. The repression of *Gli3* by EnRΔ*GATA2*-HA could largely account for the ectopic induction of motor neurons which occurs in the same context. The fact that such induction was not obtained by exogenous *Gata2*

can be explained by EnRΔGATA2-HA being a stronger repressor of Gli3 than Gata2. Overall, these results strongly suggest that Gata2 modulates the Shh pathway, which most probably underlie the inhibition of the motor neuron pathway that we have evidenced.

**ACKNOWLEDGEMENTS**

We express our gratitude to Stuart Orkin and François Guillemot for making respectively the Gata2 and the Mash1 mutant mice available, to Tomas Jessell for insightful initial discussion, and for supplying probes and antibodies. We thank E. Marti for the Smad3 expression plasmids, Anna Bigas, Pascale Gilardi, Françoise Lapointe, Douglas. Engel, François Guillemot, S. Orkin for plasmids, Chuck Stiles and Ole Madsen for anti-Olig2 and anti-Nkx6.1 antibodies, respectively. This work was supported by CNRS and UPMC institutional funds and by grants from AFM and ARC.



## REFERENCES

- Benedito, R. and Duarte, A.** (2005). Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles. *Gene Expr Patterns* **5**, 750-5.
- Briscoe, J. and Novitch, B. G.** (2007). Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T. M. and Ericson, J.** (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* **101**, 435-45.
- Craven, S. E., Lim, K. C., Ye, W., Engel, J. D., de Sauvage, F. and Rosenthal, A.** (2004). Gata2 specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog. *Development* **131**, 1165-73.
- El Wakil, A., Francius, C., Wolff, A., Pleau-Varet, J. and Nardelli, J.** (2006). The GATA2 transcription factor negatively regulates the proliferation of neuronal progenitors. *Development* **133**, 2155-65.
- Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V. and Jessell, T. M.** (1997). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **62**, 451-66.
- Ericson, J., Muhr, J., Placzek, M., Lints, T., Jessell, T. M. and Edlund, T.** (1995). Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* **81**, 747-56.
- Garcia-Campmany, L. and Marti, E.** (2007). The TGFbeta intracellular effector Smad3 regulates neuronal differentiation and cell fate specification in the developing spinal cord. *Development* **134**, 65-75.
- Guillemot, F., Lo, L. C., Johnson, J. E., Auerbach, A., Anderson, D. J. and Joyner, A. L.** (1993). Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* **75**, 463-76.
- Hemmati-Brivanlou, A., Kelly, O. G. and Melton, D. A.** (1994). Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* **77**, 283-95.
- Jessell, T. M.** (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* **1**, 20-9.

- Karunaratne, A., Hargrave, M., Poh, A. and Yamada, T.** (2002). GATA proteins identify a novel ventral interneuron subclass in the developing chick spinal cord. *Dev Biol* **249**, 30-43.
- Li, S., Misra, K., Matisse, M. P. and Xiang, M.** (2005). Foxn4 acts synergistically with Mash1 to specify subtype identity of V2 interneurons in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10688-93.
- Massague, J., Seoane, J. and Wotton, D.** (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**, 2783-810.
- Matisse, M. P., Epstein, D. J., Park, H. L., Platt, K. A. and Joyner, A. L.** (1998). Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development* **125**, 2759-70.
- Meyer, N. P. and Roelink, H.** (2003). The amino-terminal region of Gli3 antagonizes the Shh response and acts in dorsoventral fate specification in the developing spinal cord. *Dev Biol* **257**, 343-55.
- Muroyama, Y., Fujiwara, Y., Orkin, S. H. and Rowitch, D. H.** (2005). Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube. *Nature* **438**, 360-3.
- Nardelli, J., Thiesson, D., Fujiwara, Y., Tsai, F. Y. and Orkin, S. H.** (1999). Expression and genetic interaction of transcription factors GATA-2 and GATA-3 during development of the mouse central nervous system. *Dev Biol* **210**, 305-21.
- Novitsch, B. G., Chen, A. I. and Jessell, T. M.** (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* **31**, 773-89.
- Parras, C. M., Schuurmans, C., Scardigli, R., Kim, J., Anderson, D. J. and Guillemot, F.** (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* **16**, 324-38.
- Pattyn, A., Simplicio, N., van Doorninck, J. H., Goridis, C., Guillemot, F. and Brunet, J. F.** (2004). Ascl1/Mash1 is required for the development of central serotonergic neurons. *Nat Neurosci* **7**, 589-95.
- Peng, C. Y., Yajima, H., Burns, C. E., Zon, L. I., Sisodia, S. S., Pfaff, S. L. and Sharma, K.** (2007). Notch and MAML signaling drives Scf-dependent interneuron diversity in the spinal cord. *Neuron* **53**, 813-27.
- Persson, M., Stamatakis, D., te Welscher, P., Andersson, E., Bose, J., Ruther, U., Ericson, J. and Briscoe, J.** (2002). Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes Dev* **16**, 2865-78.

- Ravassard, P., Chatail, F., Mallet, J. and Icard-Liepkalns, C.** (1997). Relax, a novel rat bHLH transcriptional regulator transiently expressed in the ventricular proliferating zone of the developing central nervous system. *J Neurosci Res* **48**, 146-58.
- Sander, M., Paydar, S., Ericson, J., Briscoe, J., Berber, E., German, M., Jessell, T. M. and Rubenstein, J. L.** (2000). Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates. *Genes Dev* **14**, 2134-9.
- Smith, W. C., McKendry, R., Ribisi, S., Jr. and Harland, R. M.** (1995). A nodal-related gene defines a physical and functional domain within the Spemann organizer. *Cell* **82**, 37-46.
- Stamatakis, D., Ulloa, F., Tsoni, S. V., Mynett, A. and Briscoe, J.** (2005). A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev* **19**, 626-41.
- Streit, A., Lee, K. J., Woo, I., Roberts, C., Jessell, T. M. and Stern, C. D.** (1998). Chordin regulates primitive streak development and the stability of induced neural cells, but is not sufficient for neural induction in the chick embryo. *Development* **125**, 507-19.
- Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W. and Orkin, S. H.** (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* **371**, 221-6.
- Tsarovina, K., Pattyn, A., Stubbusch, J., Muller, F., van der Wees, J., Schneider, C., Brunet, J. F. and Rohrer, H.** (2004). Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development. *Development* **131**, 4775-86.
- Yang, X., Tomita, T., Wines-Samuelson, M., Beglopoulos, V., Tansey, M. G., Kopan, R. and Shen, J.** (2006). Notch1 signaling influences v2 interneuron and motor neuron development in the spinal cord. *Dev Neurosci* **28**, 102-17.
- Zhou, Y., Yamamoto, M. and Engel, J. D.** (2000). GATA2 is required for the generation of V2 interneurons. *Development* **127**, 3829-38.

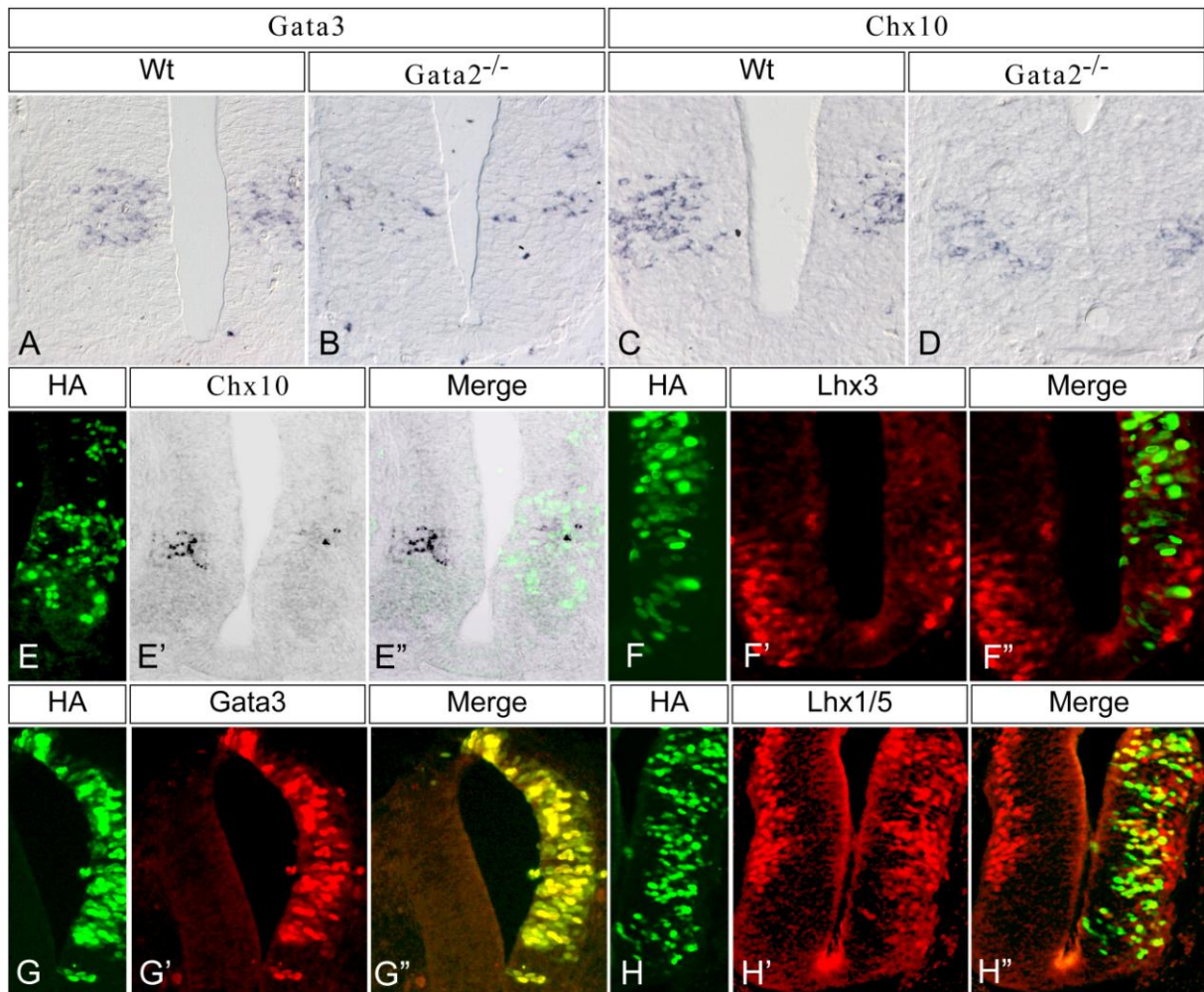


Figure 1

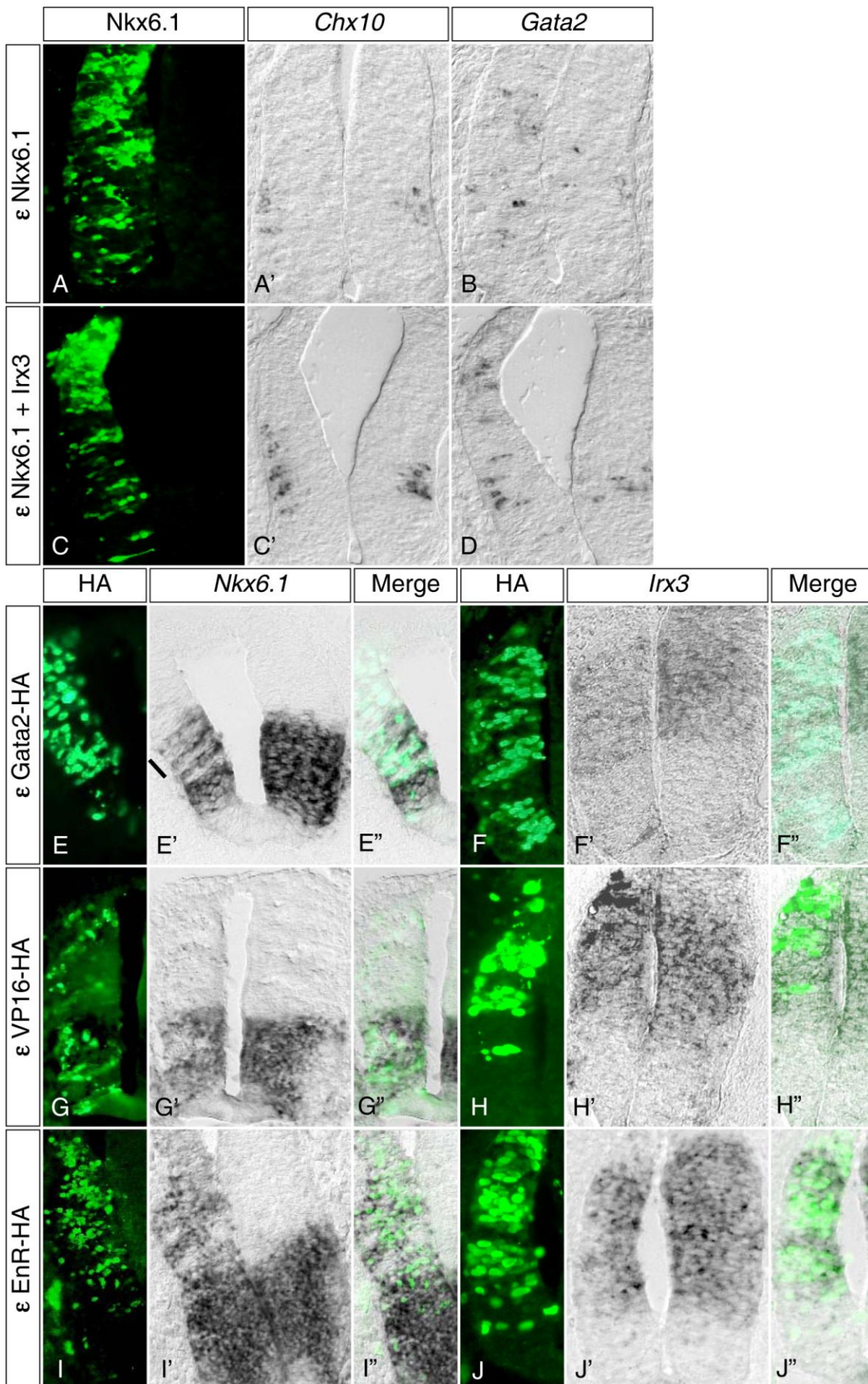


Figure 2

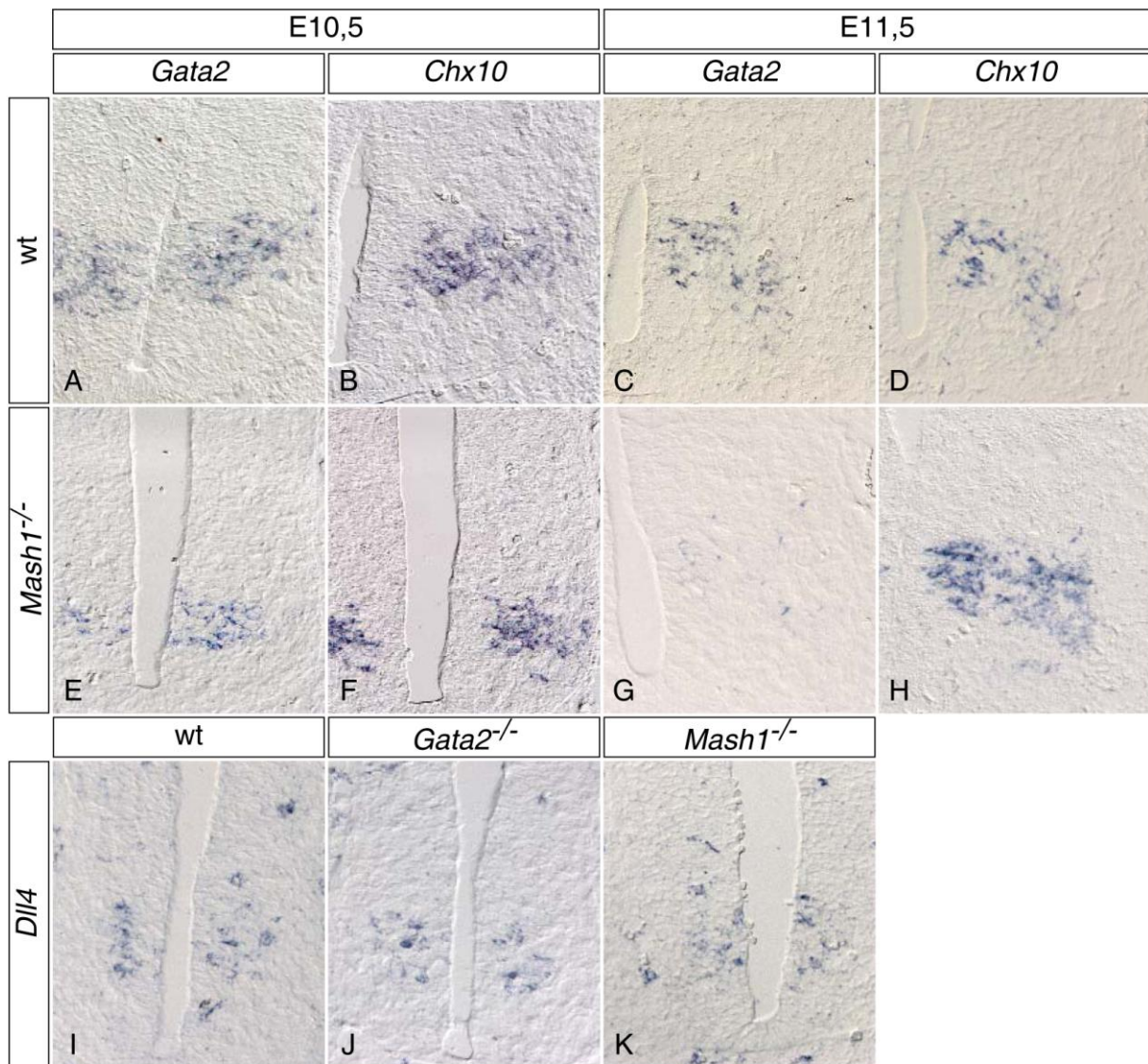


Figure 3

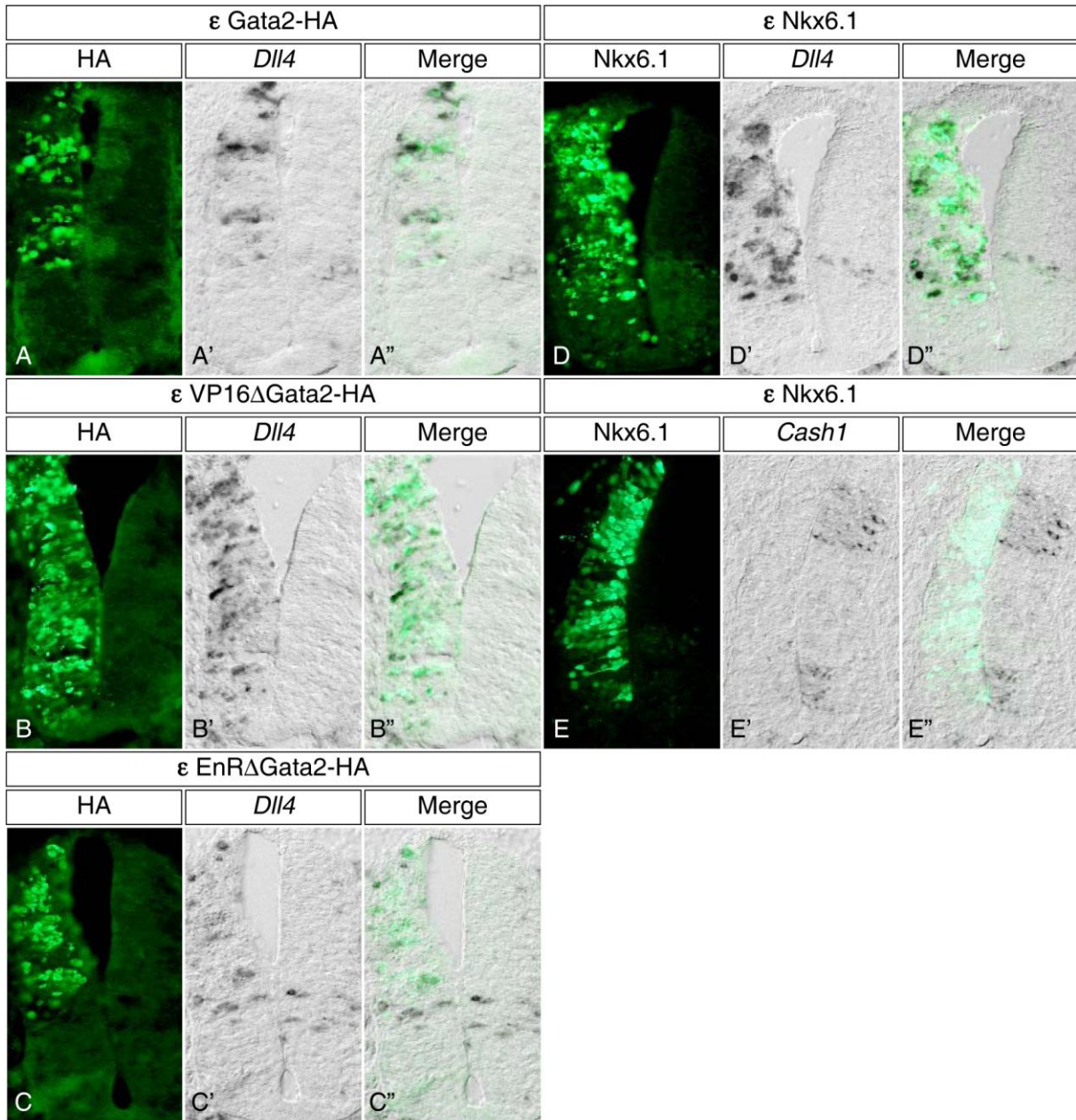


Figure 4

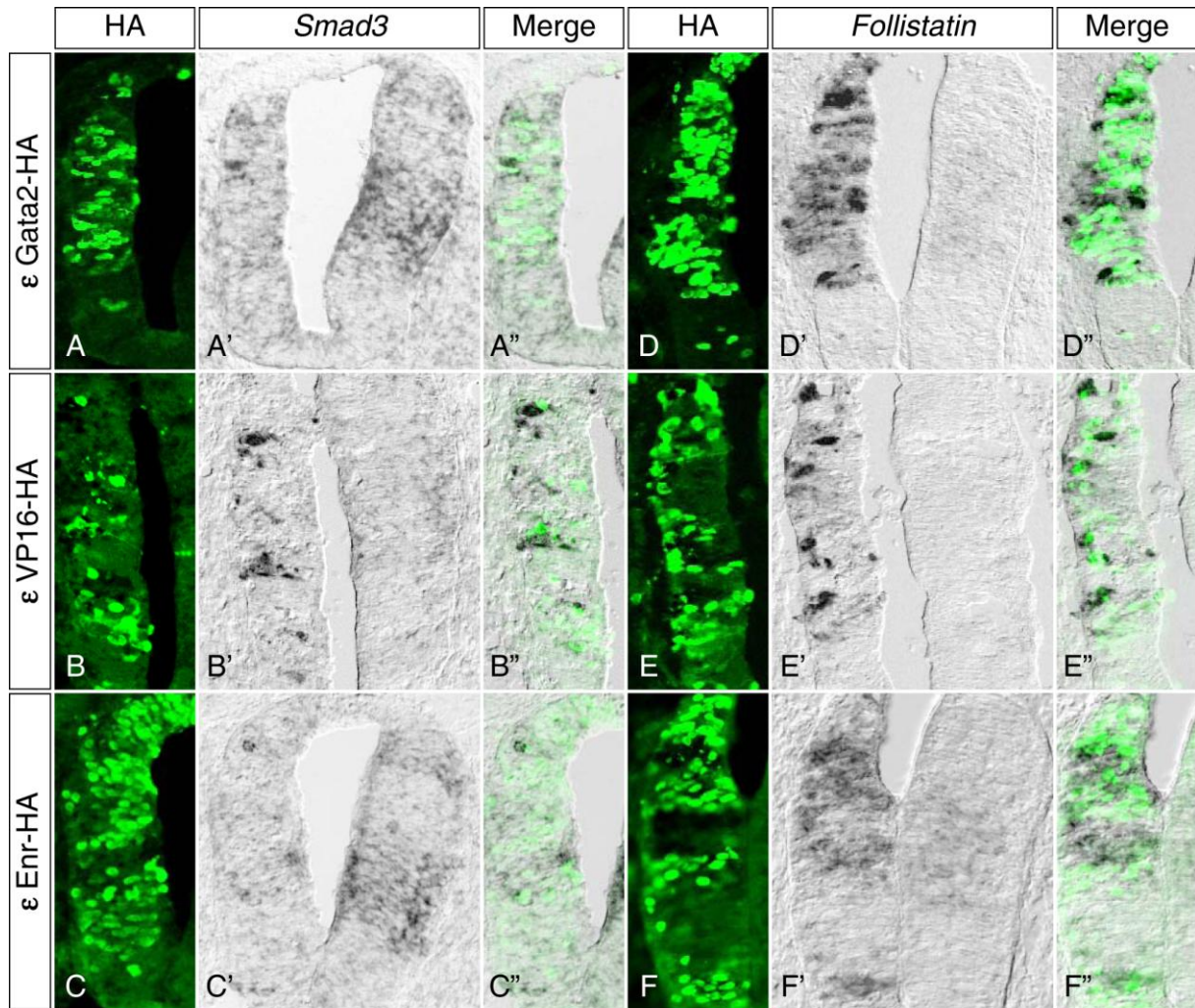


Figure 5



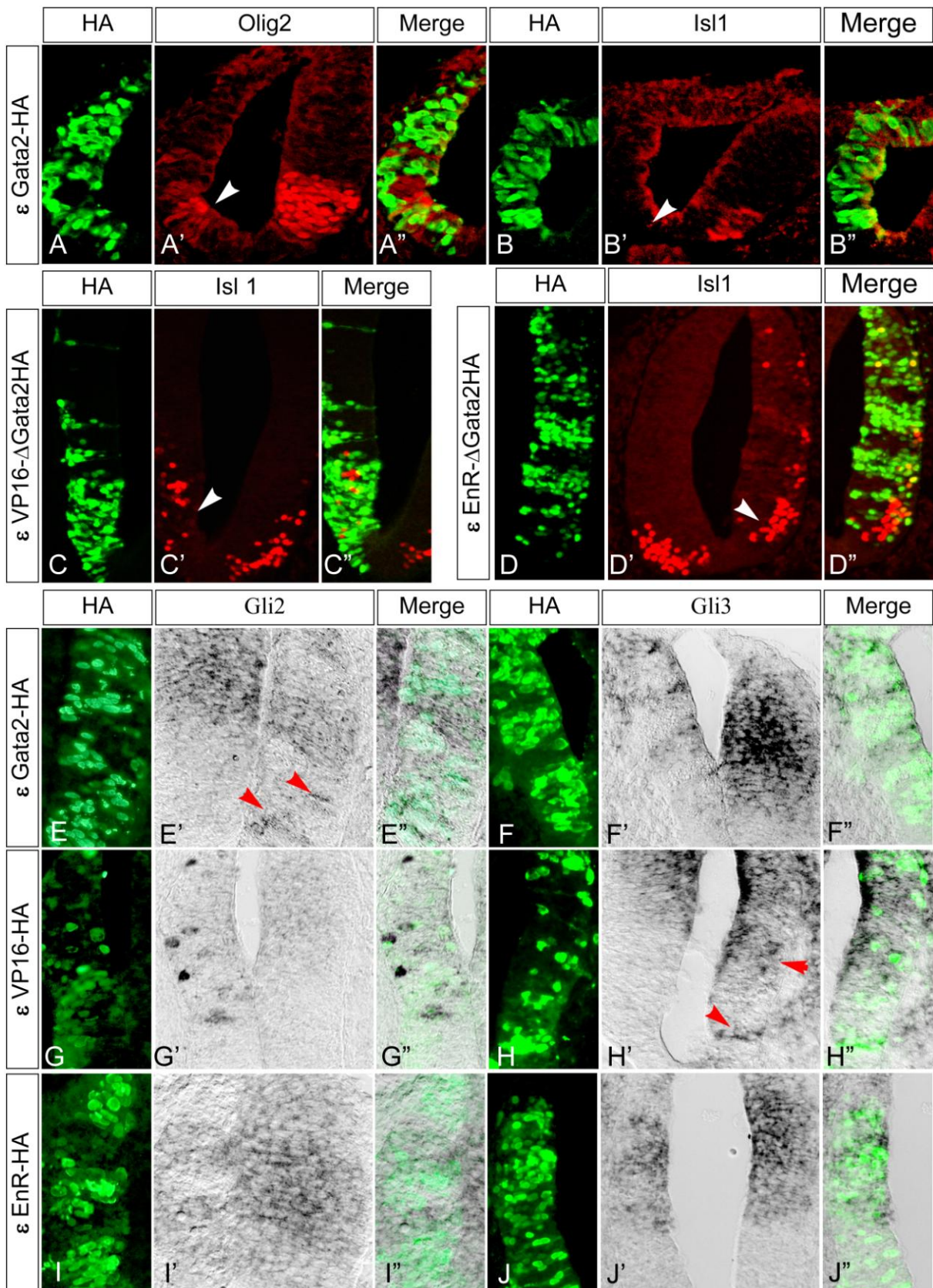


Figure 6

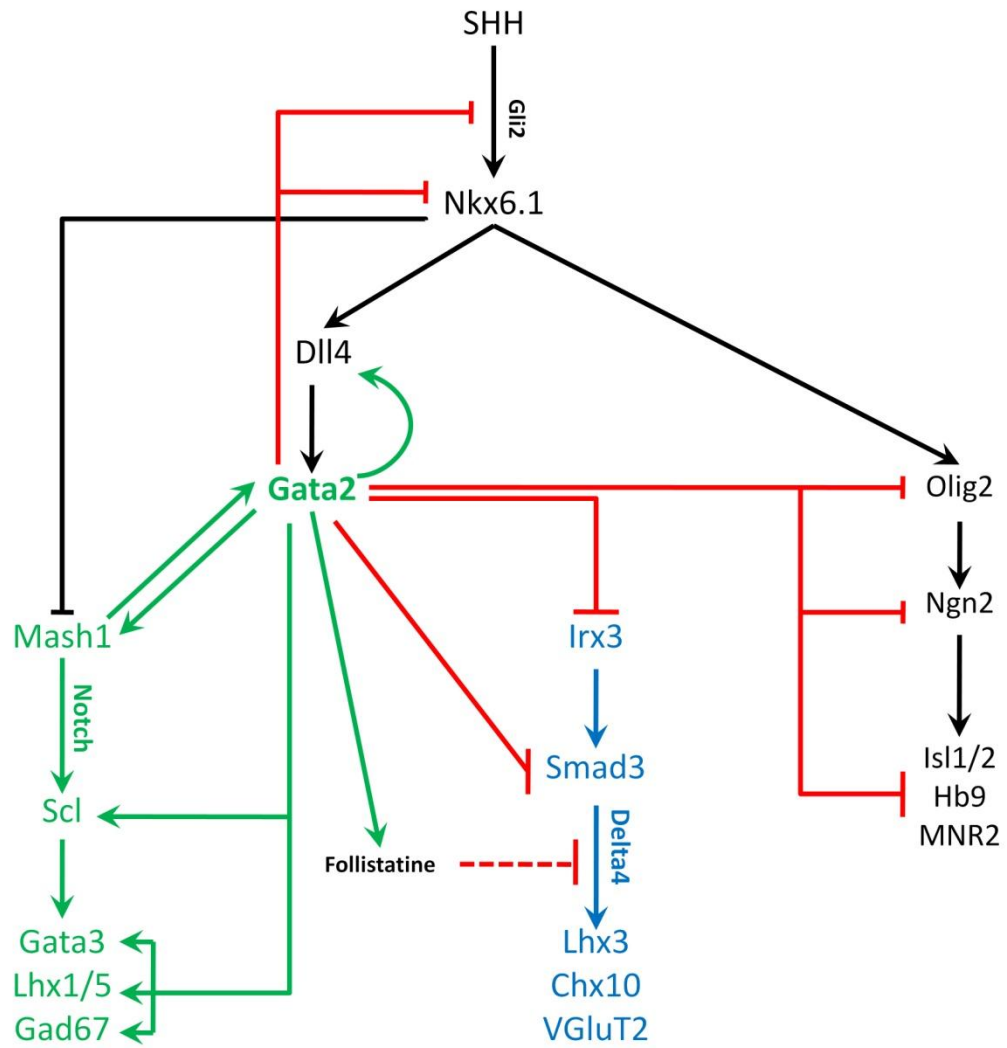


Figure 7



## LEGENDS OF FIGURES

**Figure 1:** *Gata2* participates in the production of a common V2a/V2bIN precursor and then promotes the differentiation of V2bIN at the expense of INV2A.

(A-D), transverse sections of spinal cords of wild type (A, C) and *Gata2*<sup>-/-</sup> (B, D) mouse embryos, hybridised with anti sense RNA probes for Gata3 and Chx10. E-H'', transverse sections of spinal cord of chick embryos electroporated with the pAdRSV-GATA2HA plasmid and collected 24 hours (F-H'') or 48 hours (E-E'') after electroporation. (E-E''), in situ hybridisation with a chick anti-sense RNA probe for Chx10, followed by immunostaining with anti HA epitope antibodies. (F-H''), double immunofluorescent stainings performed with mouse anti-Lhx3 (F'), anti-Gata3 (G') and anti Lhx1/5 (H') associated with rat anti-HA (F, G, H). (F'', G'', H''), superpositions of F-F'', G-G'' and H-H'', respectively.

*Gata2* inactivation appears to induce a depletion of V2 progenitors, whereas gain-of-function causes induction of V2bIN markers, GATA3 and Lhx1/5, and the repression of Chx10, a marker of INV2A.

**Figure 2:** *Gata2* is activated by *Nkx6.1* and *Irx3*, and is in turn able to control their expression.

A-J'', transverse sections of the spinal cord of chick embryos electroporated ( $\epsilon$ ) with *Nkx6.1*, alone (A-B) or in association with *Irx3* (C-D), *Gata2*-HA (E-F''), VP16 $\Delta$ *Gata2*-HA (VP16-HA) (G-H'') or EnR $\Delta$ *Gata2*-HA (EnR-HA) (I-J''). A' and B, C4 and D are adjacent sections. (A', C'), In situ hybridisations with a Chx10 anti-sense RNA probe, followed par immuostaining with anti HA antibodies (A, C). (B, D), in situ hybridisations with a *Gata2* anti-sense probe. (E', G', I') and (F', H', J'), In situ hybridisations with a *Nkx6.1* and *Irx3* anti-sense RNA probe, respectively, followed by immunostaining with anti-HA antibodies. (E'', G'', I'', F'', H'', J''), superpositions of E-E'', F-F'', G-G'', H-H'', I-I' and J-J'', respectively. *Nkx6.1*, alone or in association with *Irx3*, activates more efficiently *Gata2* than *Chx10*. *Gata2* in turn represses *Irx3* and *Nkx6.1* in its genuine domain, but can cause a dorsal extension of its expression domain.

**Figure 3:** *Mash1* is required for the maintenance of the expression of *Gata2*, but not of *Chx10*. *Gata2* and *Mash1* are not necessary for *Delta4* (*Dll4*) initial activation.

Transverse sections of the spinal cord wild type (A-D, I) and *Gata2* (J) or *Mash1* (E-H, K) null embryos, at E10.5 (A, B, E, F, I-K) and E11;5 (C, D, G, H). In situ hybridations were performed with *Gata2* (A, C, E, G), *Chx10* (B, D, F, H) and *Dll4* (I-J) anti-sense RNA probes.

**Figure 4:** *Exogenous Gata2 and Nkx6.1 induce ectopic Dll4 activation and Mash1 is fully repressed by Nkx6.1.*

(A-E''), Transverse sections of spinal cord of chick embryos collected 24 hours after electroporation with *Gata2*-HA (A-A''), VP16Δ*GATA2*-HA (B-B''), EnRΔ*GATA2*-HA (C-C'') or *Nkx6.1* (D-E''). In situ hybridisations were performed with anti-sense RNA probes for *Dll4* (A-D'') or *Cash1* (E-E''), and followed by immunostaining with anti-HA antibodies (A, B, C, D, E). A3, B'', C'', D'', E'' are superpositions of A-A', B-B', C-C', D-D' and E-E', respectively.

**Figure 5:** *Gata2*-HA misexpression results in the repression of *Smad3* and the activation *Follistatin*.

(A-F''), Transverse sections of the spinal of chick embryos collected 24 hours after electroporation with *Gata2*-HA (A-A'', D-D''), VP16Δ*GATA2*-HA (B-B'', E-E''), EnRΔ*GATA2*-HA (C-C'', F-F''). In situ hybridisations were performed with a *Smad3* (A', B', C') or a *Follistatin* (D', E', F') anti-sense RNA probe, and followed by immunostaining with anti-HA antibodies (A, B, C, D, E, F). A'', B'', C'', D'', E'' and F'' are superpositions of A-A', B-B', C-C', D-D', E-E' and F-F', respectively. Red arrow heads in B'' and F'' indicate non cell-autonomous activation of *Follistatin*.

**Figure 6:** *Gata2* represses the motor neuron genetic pathway probably by modulating the expression of *Gli2* and *Gli3*

(A-J''), Transverse sections of the spinal of chick embryos collected 24 hours after electroporation with *Gata2*-HA (A-A'', B-B'', E-F''), VP16Δ*GATA2*-HA (C-C'', G-H''), EnRΔ*GATA2*-HA (D-D'', I-J''). Double fluorescent immunostainings were performed with anti-HA antibodies (A, B, C, D) and anti-Olig2 (A') and anti *Isl1* (B, C, D) antibodies. A'', B'', C'', D'' are superpositions of A-A', B-B', C-C', D-D', respectively. *Gata2*-HA misexpression represses the motor neuron pathway (A', B'). Strikingly, EnRΔ*GATA2*-HA is able to repress the motor neuron pathway in the ventral part and to activate it dorsalwards from the motor neuron domain (D'). In situ hybridisations were performed with a *Gli2* (E', G', I') and a *Gli3* (F', H', J') anti-sense RNA probe, and followed by immunostaining with anti-HA antibodies (E, F, G, H, I, J). (E'', G'', I'', F'', H'', J''), superpositions of E-E', F-F', G-G', H-H', I-I' and J-J', respectively. *Gata2* represses *Gli3* and *Gli2* dorsally, however discrete activation of *Gli2* can be observed ventrally, likewise for *Gli3* in the context of EnRΔ*GATA2*-HA misexpression (red arrow heads in E' and H', respectively).

**Figure 7:** *Recapitulation of Gata2 functions during the development of the motor neuron and V2IN genetic pathways.*

*Gata2* is initially activated by *Nkx6.1*, probably with the participation of *Dll4*. *Gata2* then activates *Mash1*, which will participate in the maintenance of *Gata2* expression and eventually of its up-regulation. The association *Mash1/Gata2* causes repression of the motoneuron pathway (black), cross-activation of *Dll4*, which has two major opposite effects: activation of the Notch pathway required for the development of V2bIN in a subgroup of cells (green), and potentialisation of the INV2A pathway (red) in the other subgroup of the cells, presumably by interaction between *Delta* and *Smad3*, activated by *Irx3* and antagonised by *Follistatin*. The system is stabilised by feed-back regulatory loops between *Nk6.1* and *Gata2*, *Gata2* and *Irx3*. *Mash1* repression by *Nkx6.1* would be necessary to allow the INV2a pathway to take place.



### 2.3. Résultats supplémentaires.

Nos précédentes études ont montré que Gata2 peut être considéré comme un gène de spécification, car il est capable d'induire l'arrêt de prolifération, la sortie de cycle et la différenciation des progéniteurs neuronaux (El wakil *et coll.*, 2006). Dans la moelle épinière ventrale embryonnaire, il joue un rôle clé dans les mécanismes de spécification des interneurons V2, et il impose le programme de différenciation des interneurons V2b aux dépens de celui des V2a.

Toutefois, deux questions importantes restent en suspens :

- Quelle est la nature du système de neurotransmission des interneurons V2a et V2b ?
- Quel est le type de neurotransmetteur des neurones induit par la surexpression de Gata2, chez l'embryon de poulet ?
- La fonction de ces neurones, correspond elle à celle des interneurons V2 ?

Pour répondre à ces diverses questions, notre intérêt s'est porté sur les principaux neurotransmetteurs connus pour être exprimés dans la moelle épinière, tels que l'acétylcholine, le glutamate, le GABA et la glycine. Ces neurotransmetteurs peuvent être mis en évidence par la détection de leurs transporteurs ou leurs enzymes de synthèse tels que, ChAT (choline acétyl transférase) pour les motoneurons, VGluT (transporteur vésiculaire du glutamate) pour les neurones glutamatergiques, GAD (acide glutamique décarboxylase) pour les neurones GABAergiques et GlyT (transporteur vésiculaire de la glycine) pour les neurones glycinergiques.

Afin de déterminer la nature des neurotransmetteurs des interneurons V2, nous avons comparé les patrons d'expression de VGluT1, VGluT2, GAD67 et GlyT2, chez l'embryon de souris à E14.5, par rapport aux patrons d'expression de Chx10 (V2a) et de Gata3 (V2b), à l'aide d'hybridations *in situ* et de doubles hybridations *in situ*. Les résultats des expériences de doubles hybridations *in situ* seront confirmés par des doubles immunomarquages, analysés par microscopie confocale.

Nous avons identifié la nature du type neuronal induit par le gain de fonction de Gata2 chez l'embryon de poulet, en étudiant l'effet de la surexpression de Gata2 sur le patron d'expression de cGad1 (homologue de GAD67 de souris) et de cVGluT2.



### **2.3.1. Localisation des interneurones V2a et V2b.**

Dans la moelle épinière ventrale embryonnaire, les interneurones V2 sont générés à E10.5, à partir de progéniteurs neuronaux localisés dans un territoire qui est adjacent au territoire des motoneurones. Les interneurones V2 sont subdivisés en V2a et V2b, caractérisés respectivement par l'expression de Chx10 et Gata3. Ces 2 sous-types de neurones sont produits dans le même territoire, mais leur position dans la moelle épinière embryonnaire, à des stades plus tardifs qu'E10.5, n'est pas connue. Ceci suggère la question suivante :

- Quelle est la position des interneurones V2a et V2b, dans la moelle épinière, à des stades plus tardifs ?

Pour localiser les interneurones V2a et V2b, au cours du développement, nous avons étudié le patron d'expression de Chx10 et Gata3 du stade E11.5, jusqu'à la naissance (P0), à l'aide d'hybridations *in situ* et de doubles hybridations *in situ*, avec les sondes anti sens Chx10 et Gata3. Les résultats de ces expériences ont montré que durant le développement embryonnaire, les interneurones V2a et V2b sont localisés dans des territoires assez proches, mais ne présentent pas un profil poivre et sel. En effet, au stade E14.5, les interneurones V2b sont localisés dans une position plus marginale et plus ventrale, par rapport aux interneurones V2a, qui sont répartis en 2 groupes, suivant l'axe médio-latéral. (Figure 22).

De plus, nous avons constaté que l'expression de Chx10 est maintenue durant tout le développement embryonnaire et également chez l'adulte. L'expression de Gata3 reste maintenue jusqu'à E16.5, elle diminue progressivement jusqu'à la naissance et est absente dans la moelle épinière adulte.

L'ensemble de ces données suggèrent que durant le développement embryonnaire, les interneurones V2a et V2b migrent différemment. Ceci impliquerait que les interneurones V2a et V2b pourraient avoir des cibles différentes.

### **2.3.2. Le système de neurotransmission des interneurons V2.**

Afin de déterminer la nature du type de neurotransmetteur caractéristique des interneurons V2a et V2b, nous avons d'abord étudié le patron d'expression de VGluT1, VGluT2, GAD67 et GlyT2, par rapport au patron d'expression de Chx10 et Gata3, chez l'embryon de souris à E14.5, par des expériences d'hybridation in situ.

L'étude des patrons d'expression des principaux types de neurotransmetteurs présents dans la moelle épinière embryonnaire à E14.5, a montré que GAD67 et VGluT2 sont fortement exprimés dans un territoire ventral de la moelle épinière, qui pourrait correspondre au territoire des interneurons V2. Ces résultats indiquent que GAD67 et VGluT2 constituent de bons candidats.

Nous avons réalisé des expériences de doubles hybridations in situ avec les sondes anti sens Chx10 et GAD67 ou VGluT2, et également Gata3 et GAD67 ou VGluT2, dans la moelle épinière d'embryons de souris à E14.5.

#### ***2.3.2.1. Les interneurons V2a sont glutamatergiques.***

Les résultats des doubles hybridations in situ montrent que l'expression de Chx10 est préférentiellement associée à VGluT2 (Figure 23), mais pas à GAD67. Ces résultats suggèrent que les interneurons V2a seraient de type glutamatergiques. Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé des expériences de doubles immunomarquages avec des anticorps anti Chx10 et anti VGluT2 ou anti GABA ou anti GAD67. Ces marquages sont révélés par des anticorps conjugués à des fluorochromes et analysés par microscopie confocale.

Nos expériences de double marquage ont mis en évidence que dans la plupart des cellules Chx10+, il y a co-localisation avec VGluT2 (Figure 24), mais pas avec GAD67 ou GABA. Ensemble, ces résultats ont révélé que les interneurons V2a sont des neurones excitateurs de type glutamatergiques.

### **2.3.2.2. Les interneurons V2b sont GABAergiques.**

Parallèlement à la détermination du système de neurotransmission des interneurons V2a, nous avons utilisé la même approche pour déterminer la nature du système de neurotransmission des interneurons V2b. Les expériences de doubles hybridations in situ Gata3 et VGluT2 ou GAD67, ont mis en évidence que l'expression de Gata3 semble être associée à celle de GAD67 (Figure 23).

L'hypothèse selon laquelle les interneurons V2b seraient GABAergiques semble être valide. Afin de confirmer nos résultats, obtenus par doubles hybridations in situ, et surtout, confirmer la co-localisation, par analyse confocale, nous avons réalisé des doubles immunomarquages avec des anticorps anti Gata3 et anti GAD67 ou anti GABA ou anti VGluT2.

Les résultats de ces expériences indiquent que dans les interneurons V2b, Gata3 co-localise avec le GABA (Figure 24), mais pas avec VGluT2. L'ensemble de nos données indiquent que les interneurons V2b sont des neurones inhibiteurs de type GABAergiques. D'autre part, l'étude du patron d'expression de GlyT2 suggère que les interneurons V2b exprimeraient également GlyT2, c'est-à-dire que les interneurons V2b seraient GABAergiques et glycinergiques. Des expériences de doubles immunomarquages avec des anticorps anti GlyT2 permettront de confirmer ces observations. De plus, il serait intéressant de déterminer s'il existe plusieurs sous populations d'interneurons V2b, avec une sous population GABA+, GlyT2+, une sous population GlyT2+ et une sous population GABA+.

### **2.3.1. Gata2 induit la différenciation de neurones GABAergiques.**

Dans la moelle épinière, nous avons démontré que Gata2 contrôle la spécification des interneurons V2 et qu'il participe à la différenciation des interneurons V2b. Nous avons déterminé la nature des neurotransmetteurs de ces interneurons. Nos résultats ont révélé que les V2a sont glutamatergiques tandis que les V2b sont GABAergiques.

Afin de déterminer si la surexpression de Gata2 peut induire la différenciation terminale et si nous maintenons la différenciation d'interneurons V2b (GABAergiques), nous avons réalisé des expériences de gain de fonction. Ainsi, nous avons électroporé le

tube neural d'embryon de poulet au stade HH13 avec le plasmide pAdRSV-Gata2HA. Les embryons électroporés ont été prélevés et disséqués, après 48 heures d'incubation. Enfin, nous avons étudié l'effet de la surexpression de Gata2, sur la différenciation des neurones GABAergiques et glutamatergiques, par des hybridations in situ avec les sondes anti sens cGad1 et cVGlut2.

Ces expériences ont établi que Gata2 induit l'expression de cGad1 et réprime celle de cVGlut2 (Figure 25). Cette induction de cGad1 par Gata2 est observée, dans la partie ventrale comme dans la partie dorsale de la moelle épinière. Ainsi, Gata2 induit la différenciation de neurones GABAergiques (neurones inhibiteurs) dans la moelle épinière, indépendamment du contexte cellulaire.



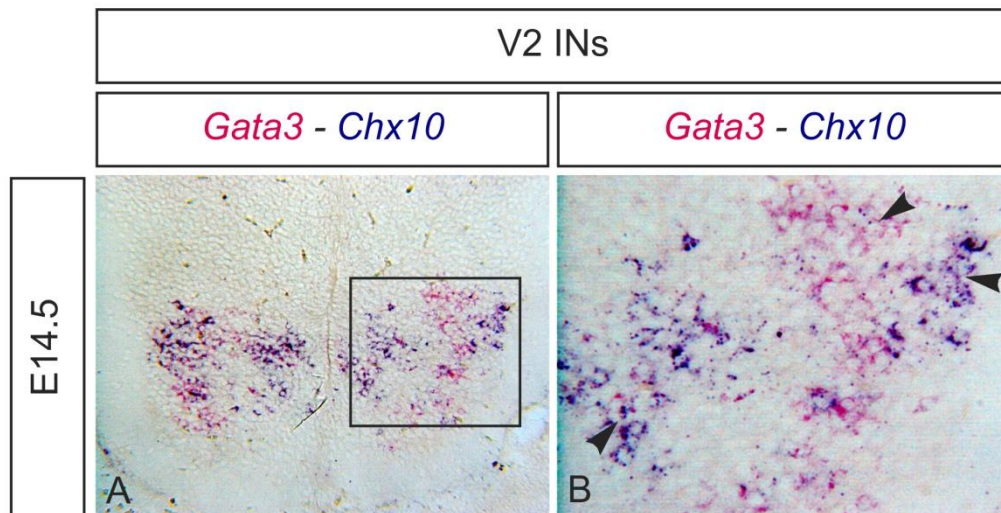


Figure 22| **Comparaison des patrons d'expression de Chx10 et Gata3**

Doubles hybridations in situ réalisées sur des coupes transversales d'embryons de souris à E14.5, avec les sondes anti sens *Chx10* en bleu. (A et B) et *Gata3* en rouge (A et B).

Les interneurons V2a (*Chx10*<sup>+</sup>) sont répartis en 2 sous groupes suivant l'axe médio-latéral, tandis que les interneurons V2b (*Gata3*<sup>+</sup>), sont localisés dans une position très marginale. En (B), un agrandissement de la région encadrée en noire en (A).

Ces expériences suggèrent que les interneurons V2a et V2b migrent différemment durant le développement embryonnaire.

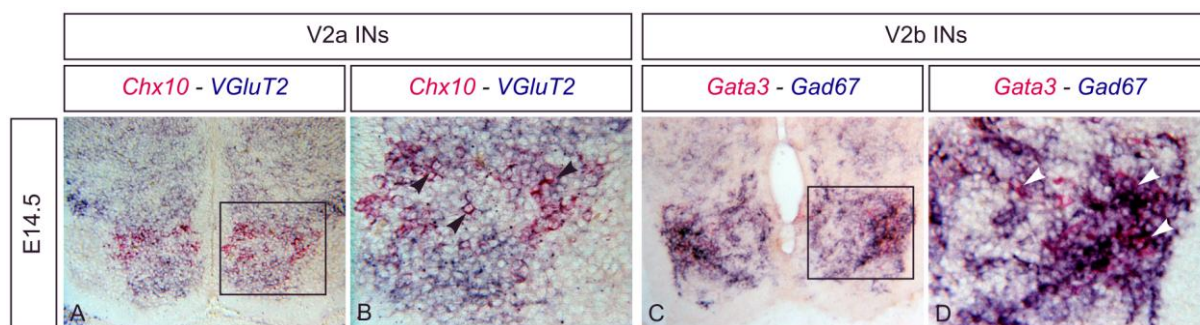


Figure 23| Comparaison des patrons d'expression de *Chx10* et *Gata3*, par rapport aux patrons d'expression de *VGluT2* et *Gad67*.

Doubles hybridations in situ réalisées sur des coupes transversales d'embryons de souris à E14.5, avec les sondes anti sens *Chx10* (A et B), *Gata3* (C et D) en rouge, *VGluT2* (A et B) et *Gad67* (C et D) en bleu.

*VGluT2* semble être exprimé dans les cellules *Chx10*+ (flèches noires), correspondants aux interneurons V2a (B), tandis que *Gad67* semble être exprimé dans les cellules *Gata3*+ (flèches blanches), correspondants aux interneurons V2b (D). En (B et D), agrandissement des régions encadrées en (A) et (C), respectivement.

Ces expériences suggèrent que les interneurons V2a (*Chx10*+) seraient glutamatergiques alors que les interneurons V2b (*Gata3*+) seraient de type GABAergiques.

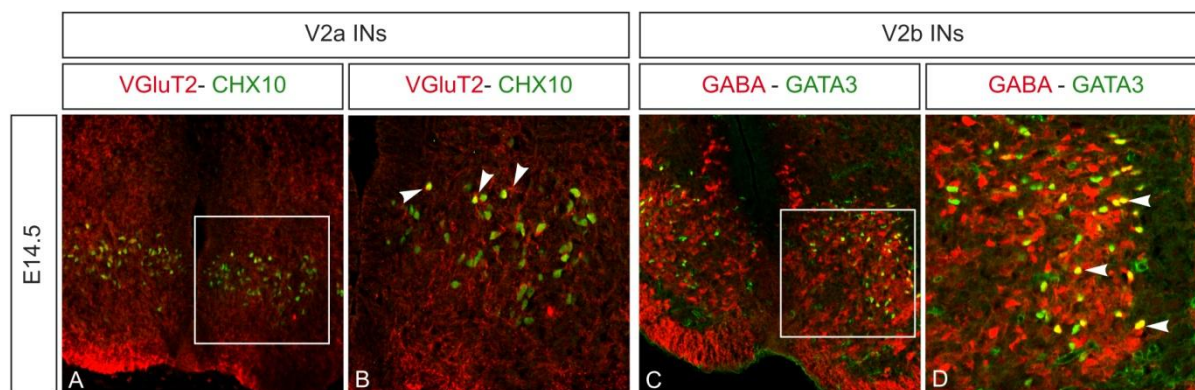


Figure 24| Les interneurons V2a sont glutamatergiques et les interneurons V2b sont GABAergiques.

Doubles immunomarquages réalisés sur coupes transversales d'embryons de souris à E14.5, avec les anticorps anti-*CHX10* (A et B), anti *GATA3* (C et D) en vert, anti *VGluT2* (A et B) et anti *GABA* (C et D) en rouge. Les flèches blanches indiquent que *Chx10* co-localise avec *VGluT2* (B) en jaune. Les flèches blanches indiquent que *GATA3* co-localise avec *GABA* (D) en jaune. En B et D, agrandissement de la partie droite de la moelle épinière respectivement, encadré en A et C.

Les résultats obtenus par doubles immunomarquages montrent que les interneurons V2a (*CHX10*+) sont excitateurs de type glutamatergiques et les interneurons V2b (*GATA3*+) sont inhibiteurs de type GABAergiques.

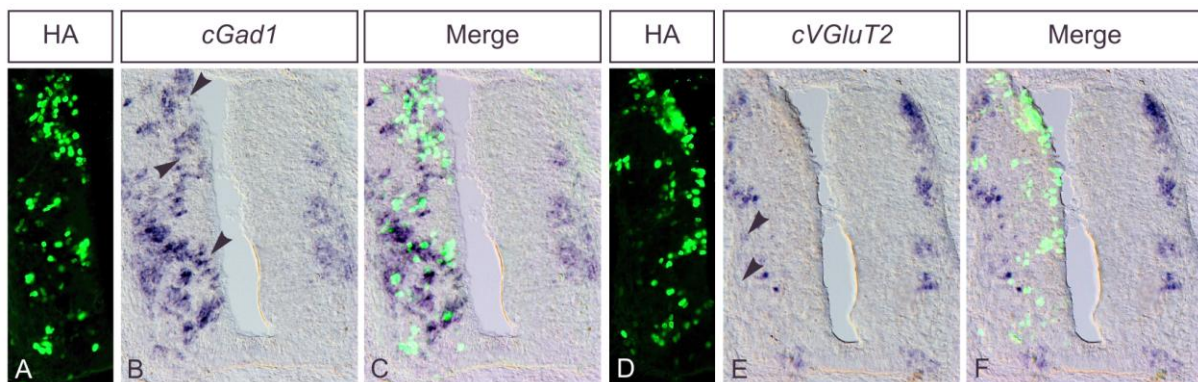


Figure 25| **Gata2 induit la différenciation de neurones GABAergiques aux dépens des neurones glutamatergiques.**

Hybridation in situ, sur coupes transversales de moelle épinière d'embryons de poulet au stade HH23, électroporés avec un plasmide permettant l'expression de la protéine de fusion Gata2HA. La moelle épinière des embryons de poulet a été électroporée au stade HH13 et les analyses ont été effectuées 48 heures après électroporation. En (A) et (D), le côté électroporé mis en évidence par immunomarquage avec un anticorps anti-HA (vert). Gata2HA induit l'expression de *cGad1* (B), comme indiqué par les flèches noires et réprime l'expression de *cVGlut2* (E), en bleu. En (C) et (F), la superposition montrant les cellules électroporées exprimant Gata2HA par rapport aux cellules exprimant *cGad1* et *cVGlut2*.

Les résultats de cette expérience montrent clairement que Gata2 induit la différenciation de neurones inhibiteurs de type GABAergique.





## 2.4. Synthèse des résultats.

De nombreuses voies de signalisation sont impliquées dans les mécanismes de spécification des interneurons ventraux, et en particulier les voies Sonic Hedgehog, TGF $\beta$ /Activine et Notch (Ericson *et coll.*, 1996 ; Hynes *et coll.*, 2000 ; Yang *et coll.*, 2006 ; Garcia-Campmany et Marti, 2007 ; Peng *et coll.*, 2007). Ces voies de signalisation sont nécessaires à l'établissement de la combinatoire de facteurs de transcription, contrôlant différentes voies de différenciation. En ce qui concerne les interneurons V2, plusieurs facteurs de transcription, tels que Nkx6.1, Irx3, Lhx3, Gata2, Mash1, FoxN4, Gata3 et Chx10, participent à leur spécification. Notre étude s'est focalisée sur la fonction Gata2 dans la cascade génétique de spécification et de différenciation des interneurons V2.

Nos résultats ont montré que Gata2 joue un rôle central au cours de la spécification des interneurons V2 et aussi lors de la dichotomie V2a/V2b. En effet, l'activation de la voie Shh induit l'expression de Nkx6.1, qui induit à son tour l'expression de Gata2. Irx3 et Gata2 inhibent le programme de différenciation des motoneurons (répression d'Olig2, Isl1/2 et MNR2), afin de permettre la différenciation des interneurons V2. Enfin, Gata2 participe à la dichotomie des interneurons V2, en favorisant la différenciation des V2b (induction de Scl et Gata3) aux dépens de celles des V2a. L'inhibition de la différenciation des V2a implique la répression d'Irx3 et Lhx3, et l'inhibition de la voie TGF $\beta$ /Activine (répression de Smad3 et induction de Follistatine).

Cette dichotomie est vraisemblablement basée sur un mécanisme de division asymétrique ou d'inhibition latérale impliquant Delta4 et Notch. En effet, dans le territoire p2, l'induction de la différenciation des V2a (Chx10+) implique l'expression d'Irx3 et Lhx3 et également l'activation de la voie TGF $\beta$ /Activine probablement par TGF $\beta$ 2 (Garcia-Campmany et Marti, 2007). Le ligand Delta4 semble jouer un rôle important dans la différenciation des V2a, car il pourrait augmenter l'effet de l'activation de la voie TGF $\beta$ /Activine (Hiratochi *et coll.*, 2007).

Enfin, nous avons identifié le système de neurotransmission des interneurons V2, les V2a sont des interneurons excitateurs de type glutamatergiques contrairement aux V2b qui sont de type inhibiteurs GABAergiques.



## 2.5. Discussion.

Notre étude a permis de mieux comprendre le rôle que Gata2 joue dans les mécanismes de spécification et de différenciation des interneurons V2. En effet, Gata2 régule négativement le programme de différenciation des motoneurons et contrôle le programme de différenciation des interneurons V2a et V2b, en interférant avec plusieurs voie de signalisation telles que les voies Shh, TGF $\beta$ /Activine et Notch. L'ensemble de nos données permettent d'attribuer une fonction de gène de spécification pour Gata2, car il impose le programme de différenciation des interneurons V2 indépendamment du contexte cellulaire.

### **2.5.1. La dichotomie V2a/V2b implique probablement une division asymétrique.**

Les progéniteurs des interneurons V2 génèrent simultanément, 2 sous-types neuronaux, en nombre égal, les V2a et les V2b. Ces 2 sous-types d'interneurones ne sont pas ségrégués dans des territoires différents comme c'est le cas pour les interneurons V0<sub>D</sub> et V0<sub>V</sub>, mais ils sont répartis de manière aléatoire au sein du même territoire. Plus tardivement, ces 2 sous-types d'interneurones V2 migrent différemment et sont caractérisés par des neurotransmetteurs différents, ce qui suggère que les V2a et les V2b auraient des cibles différentes et des fonctions différentes. Malgré les avancées importantes dans la compréhension des mécanismes de spécification et de dichotomie des interneurons V2, une question essentielle subsiste :

- La dichotomie des interneurons V2, repose t-elle sur une division asymétrique ?

Les nombreuses observations effectuées suggèrent la possibilité qu'une division asymétrique, impliquant la voie Notch, serait associée à la différenciation asymétrique du progéniteur commun p2 en interneurons V2a et V2b.

Bien que le mécanisme de la division asymétrique a été relativement bien étudié chez les invertébrés tels que la drosophile et le *caenorhabditis elegans*, chez les

vertébrés, ce mécanisme n'est pas encore bien compris. Cependant, ces études ont permis de mettre en évidence le rôle de la protéine NUMB, dans le mécanisme de la division asymétrique (Wodarz et Huttner, 2003 ; Pour revue, Huttner et Kosodo, 2005). En effet, chez les invertébrés, comme les vertébrés, les cellules du neuroépithélium sont polarisées (axe apico-basal) et la protéine NUMB, ainsi que d'autres déterminants associés à la division asymétrique sont localisés à un des pôles des cellules. Lors de la division asymétrique, ces déterminants sont répartis de manière asymétrique entre les 2 cellules-filles. L'étude par imagerie, de la répartition de ces déterminants, tels que NUMB, dans les progéniteurs des interneurons V2 et également dans les interneurons V2a (Chx10+) et V2b (Gata3+), serait nécessaire. Une étude de la répartition asymétrique de NUMB ou d'autres déterminants associés à la division asymétrique, par rapport aux marqueurs associés aux précurseurs de V2, tels que GATA2, GATA3 et CHX10 pourrait apporter des informations importantes qui permettraient de conforter l'hypothèse de la division asymétrique.

Cependant, une étude qui s'est appuyé sur une approche, basée sur le traçage rétroviral chez l'embryon de poulet a démontré que, dans la partie dorsale de la moelle épinière embryonnaire, certains progéniteurs d'interneurons dorsaux de classe B, génèrent 2 sous-types d'interneurons,  $dIL^A$  et  $dIL^B$ , après une division asymétrique. Dans ce cas particulier, Mash1 exercerait une fonction associée à la division asymétrique (Wildner *et coll.*, 2006). Or, les interneurons V2 présentent plusieurs similitudes par rapport aux interneurons  $dIL^{A/B}$ . En effet, les interneurons V2 sont générés dans le territoire, à partir d'un précurseur commun, ils sont subdivisés en V2a et V2b, qui présentent un profil de répartition en poivre et sel, et Mash1 est également associé à la différenciation des interneurons V2b. En s'inspirant de cette approche, il serait envisageable d'utiliser le système de traçage rétroviral chez l'embryon de poulet afin de mettre en évidence la division asymétrique des progéniteurs p2.

### **2.5.2. Gata2 module les voies de signalisation Notch et TGF $\beta$ /Activine.**

Au cours de la mise en place des différentes populations neuronales dans la moelle épinière embryonnaire, plusieurs voies de signalisation sont mises en jeu. Parmi elles, la voie Notch et la voie TGF $\beta$ /Activine jouent un rôle important, dans les mécanismes de spécification et de différenciation des neurones ventraux. Ainsi, des

expériences de surexpression de Smad3, ont révélé que l'activation de la voie TGF $\beta$ /Activine, probablement par le TGF $\beta$ 2, induit la différenciation d'interneurones V2a (Garcia-Campmany et Marti, 2007). Cependant, l'influence de la voie TGF $\beta$ /Activine sur la différenciation des interneurones V2b n'a pas été étudiée, ce qui soulève la question suivante :

- La voie TGF $\beta$ /Activine interfère t-elle avec la différenciation des interneurones V2b ?

Irx3 est capable d'induire l'expression de Smad3 dans la partie ventrale de la moelle épinière embryonnaire (Garcia-Campmany et Marti, 2007), donc Smad3 est en aval d'Irx3. Or, Irx3 est exprimé dans le territoire p2, et il est réprimé par Gata2, comme Smad3. Ensemble, ces données suggèrent que la voie TGF $\beta$ /Activine participe à la différenciation des interneurones V2a mais pas des V2b.

Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence l'importance de la voie Notch dans la différenciation des interneurones ventraux et des motoneurones, puisque chez l'embryon de souris Notch1<sup>-/-</sup>, la différenciation des interneurones ventraux est augmentée, aux dépens de celle des motoneurones (Yang *et coll.*, 2006). De manière assez surprenante, la perte de la signalisation Notch dans la partie ventrale de la moelle épinière embryonnaire, induit un effet similaire à celui de l'activation de la voie TGF $\beta$ /Activine. Ces données suggèrent une interférence entre ces 2 voies de signalisation, au cours de la différenciation des interneurones ventraux. Elles sont de plus appuyées par des études qui ont montré que NICD (fragment intracellulaire de Notch) peut interagir avec Smad3 pour inhiber sa fonction (Masuda *et coll.*, 2005 ; Sun *et coll.*, 2005).

Par ailleurs, dans une étude précédente (El Wakil *et coll.*, 2006), concernant le rôle de Gata2 en rapport avec le contrôle de la prolifération des progéniteurs neuronaux, nous avons démontré que Gata2 réprimait l'expression de Notch1 durant la phase neurogénique. Ces données suggèrent que dans les stades plus tardifs du développement, Notch participe aux mécanismes de spécification neuronale. Nous pouvons supposer que durant la spécification des interneurones V2, un autre récepteur Notch serait activé, comme Notch3 par exemple.

L'ensemble de ces données nous permet de proposer un modèle selon lequel, parallèlement, à la différenciation des V2b, le programme de différenciation des V2a

serait activé par défaut, en absence de Gata2. Un mécanisme d'inhibition latérale ou de division asymétrique impliquant la signalisation Notch, par l'intermédiaire de Delta4 et Notch, serait peut-être à l'origine du maintien de l'expression de Gata2 dans une des cellules-filles du progéniteur p2 (Peng *et coll.*, 2007). L'activation de Notch dans cette cellule-fille participerait à l'inhibition de la voie TGF $\beta$ /Activine (Masuda *et coll.*, 2005 ; Sun *et coll.*, 2005) et au maintien de l'expression de Gata2 (Peng *et coll.*, 2007). Gata2 induit l'expression de Scl et ensemble, ils initient le programme de différenciation des V2b (induction de Gata3 et Lhx1/5). Dans l'autre cellule-fille, Delta4 serait probablement internalisé afin de potentialiser l'activation de la voie TGF $\beta$ /Activine (Hiratochi *et coll.*, 2007 ; Garcia-Campmany et Marti, 2007). Dans cette cellule-fille, l'absence de Gata2 permettrait l'expression d'Irx3 qui induirait l'expression de Smad3 afin d'accentuer l'activation de la voie TGF $\beta$ /Activine (Garcia-Campmany et Marti, 2007). Enfin, l'induction de Lhx3 dans cette cellule serait nécessaire à la différenciation des V2a (induction de l'expression de Chx10).

Ensemble, ces données mettent en évidence le rôle de Gata2 dans l'interférence entre les voies Notch et TGF $\beta$ /Activine : d'une part un aspect complémentaire essentiel à la différenciation des interneurons V2a et médié par Dll4 ; d'autre part une activation de la voie Notch, qui antagonise la voie TGF $\beta$ /Activine et qui est nécessaire à la différenciation des interneurons V2b.

Néanmoins, toutes les situations qui ont été étudiées montrent que l'induction de l'expression de Chx10 (V2a) est plus difficile à obtenir et assez limitée, comparée à l'induction de l'expression de Gata3. En effet, Gata2 dominant négatif n'induit pas la différenciation des interneurons V2a alors qu'il induit l'expression de Nkx6.1 et Lhx3, mais réprime Irx3, qui est nécessaire pour induire Smad3.

Afin de mettre clairement en évidence, l'importance de la voie TGF $\beta$ /Activine, dans la différenciation des interneurons V2a, nous sommes sur le point de réaliser des expériences de surexpression de la protéine Smad3<sup>Act</sup> (activateur constitutif), seule ou, en présence d'EnR $\Delta$ Gata2 (Gata2 dominant négatif). L'activation de la voie TGF $\beta$ /Activine, dans les cellules électroporées avec EnR $\Delta$ hGata2, devrait permettre la différenciation des progéniteurs neuronaux en interneurons V2a.

### **2.5.3. Gata2 module la voie Shh et inhibe la différenciation des motoneurones.**

#### ***2.5.3.1. Gata2 module la signalisation Shh.***

L'induction de l'expression de Nkx6.1 est dépendante de l'activation de la voie Shh. Nkx6.1 est suffisant à lui seul, pour induire l'expression de Gata2, également celle de Chx10 de manière très limitée, mais pas celle de Gata3. De plus, Gata2 peut réprimer l'expression de Nkx6.1. Ces résultats suggèrent d'une part que l'expression de Gata2 est dépendante de la signalisation Shh et d'autre part que Gata2 modulerait l'activation de la voie Shh en retour, ce que nous avons essayé de déterminer.

La modulation des transducteurs de la signalisation Shh, peut expliquer en partie, la capacité de Gata2 à réprimer Nkx6.1 et à inhiber la différenciation des motoneurones. Ainsi, l'inhibition de la voie Shh, par la répression de l'expression de Gli2, permet d'expliquer la répression de l'expression de Nkx6.1. Concernant la protéine de fusion Gata2 dominant répresseur, elle réprime aussi l'expression de Gli2, ce qui entraîne l'inhibition de la différenciation des motoneurones. Dans la partie dorsale de moelle épinière, il réprime l'expression de Gli3, et permet l'induction ectopique de motoneurones. Contrairement à EnRΔGata2, Gata2 serait incapable d'induire l'expression de marqueurs de motoneurones dans la partie dorsale de la moelle épinière, probablement parce qu'il serait un répresseur moins fort que le domaine EnR.

Dans la partie dorsale de la moelle épinière, l'expression de Gli2 et de Gli3 est dépendante d'autres voies de signalisation telles que la voie des BMP et la voie WNT (Lei *et coll.*, 2006 ; Riobo et Manning, 2007). Nous pouvons alors nous demander, si Gata2 interfère avec les voies de signalisation BMP et WNT par exemple. Il serait intéressant d'étudier les conséquences de la surexpression de Gata2 sur les voies de signalisation BMP et WNT. Nos données préliminaires indiquent que la surexpression de Gata2 dans la partie dorsale de la moelle épinière embryonnaire, n'affecte pas le patron d'expression de Wnt1 mais affecte celle de Wnt3a. Ces données suggèrent que Gata2 pourrait interférer avec la voie WNT. Une étude plus large, des voies de signalisation BMP et WNT devrait apporter des informations importantes.



### **2.5.3.2. *Gata2 et l'inhibition du programme de différenciation des motoneurones.***

De manière intéressante, nos résultats ont établi que *Gata2* inhibe la différenciation des motoneurones. Il réprime l'expression d'*Olig2*, probablement en activant un répresseur et également l'expression des facteurs de transcription en aval d'*Olig2* et qui participent à la différenciation des motoneurones tels que *Lhx3*, *Isl1/2* et *MNR2*. En essayant de mieux comprendre ce mécanisme, nous avons mis en évidence une régulation complexe des composants de la voie de la voie *Shh*, tels que *Gli2* et *Gli3*.

L'induction étonnante de l'expression ectopique dorsale de marqueurs de motoneurones par *EnRΔGata2* peut être expliquée par la capacité d'*EnRΔGata2* à réguler négativement l'expression de *Gli2* et *Gli3* dans la partie dorsale de la moelle épinière. Ces résultats paraissent suggèrent que la répression de l'expression de *Gli2* et *Gli3* par *EnRΔGata2*, induit probablement une interférence avec les autres voies de signalisation qui contrôlent l'expression des *Glis* dans la partie dorsale de la moelle épinière, telle que la signalisation *FGF*, *BMP* ou par d'autres mécanismes (Brewster *et coll.*, 2000 ; Borycki *et coll.*, 2000 ; Ruiz i Altaba *et coll.*, 2002 ; Barnfield *et coll.*, 2005 ; Gutin *et coll.*, 2006 ; Zhao *et coll.*, 2006).

En résumé, la capacité de *Gata2* à réprimer la différenciation des motoneurones peut s'expliquer par la modulation de la voie *Shh*, probablement en établissant un équilibre entre la fonction de *Gli2* d'une part, et celle de *Gli3* d'autre part. Il est connu qu'un tel équilibre est déterminant pour la spécification neuronale et que toute perturbation peut modifier le devenir des cellules. L'établissement de cet équilibre met très probablement en jeu qui restent à élucider, Nos prochaines électroporations de *Smad3* pourraient apporter des éclaircissements.

L'inhibition de la différenciation des motoneurones participe certainement à délimiter la frontière ventrale du territoire de différenciation des interneurones V2. Inversement, nous pouvons penser qu'il existe vraisemblablement un système de répression croisée afin de limiter l'expression de *Gata2* aussi bien dans le territoire pMN que dans le territoire dorsal au territoire de différenciation des interneurones V2, le territoire p1. Ainsi des facteurs de transcription spécifiques du territoire pMN tel qu'*Olig2*, ou encore *En1* ou *Dbx2* dans le territoire p1 pourraient réprimer l'expression

de Gata2, alors que Gata2 les réprimerait en retour. Il est probable que les niveaux d'expression de Gli3 et Gli2 soient responsables de la répression de l'expression de Gata2 dans des territoires plus dorsaux.

#### **2.5.4. L'influence de Gata2 sur la spécification des autres populations neuronales.**

Nous avons mis en évidence le rôle important de Gata2 dans la délimitation de la frontière ventrale du territoire de différenciation des interneurons V2. Toutefois, nous pouvons nous demander quel peut être le rôle de Gata2 dans la délimitation de la frontière dorsale du territoire p2. D'autre part, quel peut être l'effet de la surexpression de Gata2 sur les populations neuronales plus dorsales par rapport aux interneurons V2, telles que les interneurons V1 et V0, ou encore les interneurons dorsaux.

##### ***2.5.4.1. Effet de Gata2 sur la différenciation des interneurons V0 et V1.***

Nos résultats suggèrent que la surexpression de Gata2 affecte très probablement l'ensemble des populations neuronales qui sont dorsales au territoire d'expression de Gata2. En effet, nos données montrent que l'expression ectopique de Gata2 modifie le patron d'expression de Gli3 et également de Gli2. Gata2 inhibe également la voie TGF $\beta$ /Activine qui est impliquée dans la différenciation des interneurons V0 et V1 (Garcia-Campmany et Marti, 2007). L'induction de l'expression de Gata2 induit l'expression de Gata3 et de Lhx1/5 dans le territoire de différenciation de ces interneurons. Gata2 induit la différenciation de neurones inhibiteurs de type GABAergiques (induction de l'expression de Gad1, homologue de GAD67 de la souris) dans la moelle épinière embryonnaire de poulet, 48 heures après électroporation et inhibe la différenciation des interneurons excitateurs (répression de l'expression de cVGlut2).

Ensemble, ces données semblent confirmer la capacité de Gata2 à respécifier les progéniteurs neuronaux tels que ceux des interneurons V0 et V1. L'étude de l'effet de Gata2 sur l'expression des marqueurs génétiques des interneurons V0 et V1, tels qu'En1 et Evx1/2 devrait nous permettre de confirmer cette hypothèse. De même,

l'analyse de l'effet de la surexpression de Gata2, sur la voie acide rétinoïque, une voie de signalisation qui joue un rôle important dans la différenciation des interneurons V0 et V1 (Wilson *et coll.*, 2004 ; Maden, 2006 ; Lupo *et coll.*, 2006), permettrait d'éclaircir le rôle de Gata2 dans l'établissement de la frontière dorsale du territoire de différenciation des interneurons V2 et de valider ou non notre hypothèse.

#### **2.5.4.2. Effet de Gata2 dans le territoire de spécification des interneurons V3.**

Concernant l'effet de Gata2 sur la spécification des interneurons V3, plusieurs hypothèses sont envisageables, puisque dans la moelle épinière ventrale embryonnaire, les progéniteurs des interneurons V3 expriment les gènes Nkx2.2 et Ngn3, alors que dans le rhombencéphale, les progéniteurs des neurones sérotoninergiques expriment Nkx2.2, Mash1 et Gata2 (Craven *et coll.*, 2004).

En effet, nous avons clairement établi que Gata2 inhibe la différenciation des motoneurons. D'autre part, la surexpression de Gata2 dans le territoire de spécification des interneurons V3, semble affecter également la différenciation de ces derniers. La spécification de ces interneurons est dépendante de l'activation de la voie Shh et de l'expression de Gli2. De plus, ces interneurons sont excitateurs, de type glutamatergiques. Or Gata2 modifie le patron d'expression ventral (modulation de la signalisation Shh et répression Gli2) et induit l'expression de marqueurs d'interneurons V2b tels que Gata3 et Lhx1/5. Si Gata2 inhibe la différenciation de cette population neuronale, nous pouvons poser la question suivante, quel peut être le devenir des progéniteurs neuronaux du territoire p3 en présence de Gata2 ?

En effet, si Gata2 ne réprime pas l'expression de Nkx2.2 comme c'est le cas pour Nkx6.1, nous pouvons penser que la combinaison Nkx2.2 et Gata2 pourrait être suffisante pour induire la différenciation de neurones sérotoninergiques dans la moelle épinière ventrale. Néanmoins, nous ignorons si Gata2 réprime ou non l'expression de Ngn3 et si Ngn3 n'est pas réprimé, quelle pourrait être son influence sur la différenciation neuronale ? Une des possibilités serait que Gata2 induirait l'expression de Mash1 aux dépens de Ngn3, ce qui favoriserait la différenciation de neurones sérotoninergiques dans le territoire p3. Enfin l'autre possibilité serait que l'expression

ectopique de Gata2 réprime l'expression de Nkx2.2 et induit la différenciation d'interneurones V2 dans le territoire de différenciation des interneurones V3. Des analyses de l'effet de la surexpression de Gata2 sur la différenciation des interneurones V3 et notamment de l'influence de Gata2 sur l'expression de Nkx2.2, Ngn3 et Sim1 permettraient de valider notre seconde hypothèse.

#### **2.5.4.3. Effet de Gata2 sur la différenciation des interneurones dorsaux.**

La répression de Gli3 dans la partie dorsale de la moelle épinière embryonnaire suggère également que Gata2 est capable de moduler les voies de signalisation BMP ou FGF qui sont impliquées dans l'établissement du patron d'expression dorsal et en particulier, dans la spécification des interneurones dorsaux. D'autre part, Gata2 induit l'expression ectopique de Gata3, Cash1 (homologue de Mash1 chez le poulet), Lhx1/5 et cGad1 (homologue de Gad67 chez le poulet) dans la partie très dorsale de la moelle épinière. Afin de déterminer si Gata2 inhibe la différenciation des interneurones dorsaux au profit d'interneurones V2 ou d'autres types neuronaux, il serait nécessaire de déterminer l'influence de Gata2 sur le patron d'expression dorsal. D'abord, il serait intéressant de vérifier si l'expression ectopique de Gata2 est suffisante pour réprimer ou altérer l'expression des gènes impliqués dans le patron d'expression dorsal tels que Wnt1, Wnt3a, Pax3, Pax7, Math1, Mash1, Ngn1 et Ngn2 (Pour revue ; Helms et Johnson, 2003). Concernant Mash1 et Ngn2, nous avons démontré que Gata2 réprime l'expression de Ngn2 et induit celle de Mash1. Il serait possible que la répression de l'expression de Ngn2 et l'expression ectopique de Mash1 et Gata3 dans les progéniteurs des interneurones dorsaux, induisent la resspécification de ces derniers en interneurones V2.

Néanmoins, nous pourrions avoir quelques difficultés à déterminer si Gata2 est bien responsable de l'induction de la différenciation de neurones GABAergiques dans la partie dorsale de la moelle épinière. En effet, certains interneurones dorsaux sont de type GABAergiques tel que les interneurones  $dIL^{A/B}$ , di4 et di6 (Glasgow *et coll.*, 2005 ; Mizuguchi *et coll.*, 2006 ; Pillai *et coll.*, 2007), d'où la nécessité de s'assurer que Gata2 réprime ou altère l'expression des facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des interneurones dorsaux, tels que Pax2, Lbx1, Lmx1b, Tlx1 et Brn3a (Muller *et coll.*, 2002 ; Qian *et coll.*, 2002 ; Gross *et coll.*, 2002 ; Ding *et coll.*, 2004)

### **2.5.5. Gata2 induit la différenciation de neurones GABAergiques dans la moelle épinière.**

Nous avons montré que la surexpression de Gata2 chez l'embryon de poulet, induit la différenciation des progéniteurs neuronaux de la moelle épinière, en neurones GABAergiques. De plus, nos observations chez des embryons de souris à E14.5 ont montré que dans la moelle épinière, les interneurons V2a sont glutamatergiques (Chx10+, VGluT2+) tandis que les V2b sont GABAergiques (Gata3+, GABA+). Toutefois, nous n'avons pas déterminé, si la surexpression de Gata2 chez l'embryon de poulet, induit la différenciation d'autres types neuronaux, comme par exemple des neurones sérotoninergiques dans le territoire d'expression de Nkx2.2 dans la moelle épinière embryonnaire. D'autre part, nous n'avons pas déterminé si Gata2 induit la différenciation d'un seul type neuronal (vraisemblablement de type GABAergique) quelle que soit la position des cellules électroporées, le long de l'axe antéro-postérieur (télencéphale, mésencéphale, rhombencéphale et moelle épinière par exemple) et quel que soit le contexte cellulaire. Des expériences de doubles marquages chez l'embryon de poulet électroporé avec le plasmide permettant l'expression de Gata2 dans l'ensemble du système nerveux central (du télencéphale à la partie la plus caudale de la moelle épinière), devrait permettre de déterminer si Gata2 induit uniquement des neurones GABAergiques ou si le contexte cellulaire peut avoir une influence sur le type de programme de différenciation.

## **2.6. Conclusion.**

Nos travaux ont porté sur l'étude de la fonction de Gata2, durant les mécanismes de spécification et de différenciation des interneurons V2. Nos résultats ont établi que Gata2 est un gène maître, qui contrôle la spécification des progéniteurs des interneurons V2. Il inhibe le programme de différenciation des motoneurons en modulant la signalisation Shh. D'autre part, Gata2 joue un rôle clé dans la dichotomie V2a/V2b, et contrôle la différenciation des V2b aux dépens de celle des V2a, en interférant avec les voies de signalisation TGFb/Activine et Notch. Cette dichotomie des interneurons V2 implique vraisemblablement un mécanisme d'inhibition latérale ou une division asymétrique impliquant Notch et Delta4.



## **DISCUSSION**

---





## DISCUSSION

### **1. Gata2 est un gène de spécification.**

#### **1.1. Gata2 régule la prolifération des progéniteurs neuronaux.**

Nous avons mis en évidence, une nouvelle fonction de Gata2 durant la neurogenèse dans le tube neural. En effet, Gata2 exerce la fonction de régulateur négatif de la prolifération des progéniteurs neuronaux, aussi bien *in vivo*, qu'en culture (El Wakil *et coll.*, 2006). Nous pouvons envisager d'étendre l'étude de la fonction de Gata2, comme régulateur négatif de la prolifération, à l'identification d'une hypothétique fonction anti tumorale de Gata2. Cette étude nécessitera la réalisation des expériences de transfections de lignées tumorales humaines qui permettraient de valider l'hypothèse d'une nouvelle fonction pour Gata2. Plus généralement, si Gata2 exerce une fonction anti tumorale, il serait intéressant d'étudier les mutations éventuelles, qui pourraient affecter la fonction du gène, certaines lignées de cellules tumorales (dérivées du système nerveux par exemple).

#### **1.2. Gata2 contrôle la mise en place des interneurones V2.**

Par ailleurs, Gata2 semble exercer la fonction de gène maître, au cours de la spécification et la différenciation des interneurones V2, et secondairement, il impose l'initiation du programme de différenciation des interneurones V2b, en interférant avec des voies de signalisation telles que Shh, TGF $\beta$ /Activine et Notch. Ensemble, ces données démontrent que dans la moelle épinière embryonnaire, le gène Gata2 peut être considéré comme un gène de spécification neuronale (voir figure 7 de l'article).

Le progéniteur commun du territoire p2 génère les interneurones V2, qui sont subdivisés en 2 sous types neuronaux, V2a et V2b, qui sont respectivement glutamatergiques et GABAergiques. Ces 2 sous types peuvent être considérés comme

étant fonctionnellement différents et pourraient avoir des cibles différentes. Il semblerait que les interneurons V2b constituent une sous population hétérogène, car nos observations préliminaires suggèrent qu'une partie des V2b serait glycinergique. Ces informations suggèrent que les interneurons V2b présenteraient des différences au niveau fonctionnel et peut être au niveau de leur cibles. L'ensemble de ces données constituent un superbe exemple d'accroissement de la diversité neuronale à partir d'une même population de progéniteurs, puis au sein d'une sous population neuronale donnée. Elles illustrent bien la complexité des mécanismes permettant de générer la diversité neuronale dans le système nerveux central.

De manière intéressante, nous pouvons remarquer que durant le développement du système nerveux embryonnaire, l'expression de Gata2 est très souvent associée à celle de Mash1. Mash1 participe aux mécanismes de spécification de nombreux types neuronaux. En effet, il est impliqué dans la différenciation des neurones sérotoninergiques dans la partie ventrale du rhombencéphale (Craven *et coll.*, 2004 ; Pattyn *et coll.*, 2004), des neurones GABAergiques dans la partie ventrale du télencéphale (Fode *et coll.*, 2000), de certains interneurons dorsaux GABAergiques dans la partie dorsale de la moelle épinière (Helms *et coll.*, 2005) et des neurones catécholaminergiques dans le locus coeruleus (dans le cerveau postérieur). Enfin, dans le système nerveux sympathique, il participe à la spécification et la différenciation des neurones adrénergiques (Tsarovina *et coll.*, 2004).

D'autre part, au cours du développement, Gata2 est exprimé dans certains territoires du télencéphale, mais son patron d'expression doit être mieux étudié.. Une étude plus large, du patron d'expression dans de Gata2 dans le système nerveux central, du stade embryonnaire au stade adulte est d'ailleurs en cours. Cette étude devrait permettre de déterminer :

- Les territoires d'expression de Gata2 au cours du développement du cerveau et également dans le cerveau adulte.
- Si ces populations cellulaires exprimant Gata2 correspondent à des progéniteurs neuronaux.
- Si Gata2 est co-exprimé avec Mash1 dans le télencéphale.
- Si ces populations neuronales co-expriment Gata2 et Mash1, sont-elles de type GABAergiques ?

L'étude des cellules Gata2+ dans le cerveau permettrait de préciser la fonction de Gata2 dans d'autres territoires du système nerveux central. En effet, nous pouvons supposer que Gata2 pourrait y exercer une fonction sur le cycle cellulaire ou sur la survie de ces populations cellulaires.

## **2. Les limites expérimentales.**

Les expériences en contexte de gain de fonction nous ont apporté des informations essentielles à la compréhension de la séquence d'activation de la cascade génétique de spécification des interneurons V2. Néanmoins, notre étude fonctionnelle de Gata2 a été compliquée pour diverses raisons et en particulier pour des raisons techniques.

### **2.1. Les expériences en contexte de gain de fonction.**

Le contexte de gain de fonction a été obtenu, par électroporation du tube neural d'embryons de poulet, au stade HH12-13, avec un vecteur d'expression ubiquitaire fort, le pAdRSV-Gata2HA. Nos données suggèrent l'existence d'une fenêtre temporelle, durant laquelle, les progéniteurs neuraux seraient plus plastiques et plus sensibles. Toutefois, l'ensemble de nos expériences a été réalisé à des stades équivalents, afin de faciliter l'interprétation des résultats. Les embryons électroporés ont été incubés à 38°C pendant 24 à 48 heures après électroporation. L'ensemble de nos expériences de gain de fonction a nécessité l'électroporation de plus de 1500 embryons de poulet, pour un taux de survie supérieur à 65%. L'utilisation du modèle poulet présente de nombreux avantages puisque les embryons de poulets se développent assez rapidement, ils sont facilement accessibles et nous pouvons réaliser les électroporations à différents stades du développement.

### **2.1.1. Le choix du stade d'électroporation.**

Nous pouvons noter que le stade de développement durant lequel, le tube neural des embryons de poulet est électroporé est important. Nous avons constaté que le taux de survie des embryons dépend de plusieurs paramètres. Ainsi, les effets de la surexpression de Gata2, sur le cycle cellulaire et sur la différenciation neuronale sont plus nets, lorsque les électroporation sont réalisées chez des embryons plus jeunes (au stade 10 paires de somites, HH12). Néanmoins, chez ces embryons, le taux de survie est diminué, malgré une bonne maîtrise des injections de la solution d'ADN dans la lumière du tube neural. D'autre part, si nous modifions les paramètres de l'électroporateur (diminution du voltage, diminution du nombre de pulses ou encore augmentation de l'écart entre les électrodes), nous pouvons augmenter le taux de survie de ces embryons. Cependant, cette augmentation de la survie s'accompagne de la diminution de l'efficacité de la transfection des cellules du tube neural.

Parallèlement, chez des embryons électroporés à des stades plus tardifs (stade 20 paires de somites), nous observons un taux de survie excellent et une très bonne qualité de transfection, mais les effets de la surexpression peuvent être moins forts. En résumé, il est important de trouver un bon compromis entre le stade d'électroporation et les paramètres d'électroporation. Les optimisations que nous avons apportées, ont permis d'améliorer le rendement de nos expériences d'électroporation, puisque nous obtenons généralement un taux de survie de plus de 80%, accompagné d'une qualité d'électroporation très bonne (électroporation des cellules suivant l'axe dorsoventral et suivant l'axe médio latéral).

### **2.1.2. Les limites de l'utilisation des vecteurs plasmidiques.**

Ces expériences ont permis d'établir le rôle de Gata2 dans la différenciation de neurones GABAergiques, 48 heures après électroporation. Toutefois, nous n'avons pas pu réaliser des analyses à des stades plus tardifs, car nous sommes limités par les vecteurs d'expression de type plasmidique. En effet, 48 heures après électroporation, nous constatons une nette diminution du niveau d'expression des cellules électroporées

et notons également une diminution significative, du pourcentage de cellules électroporées. Cette diminution s'explique en partie, par la dilution du plasmide, au fil des nombreuses divisions cellulaires et aussi par la possibilité que le plasmide s'intègre au génome du poulet, ce qui entrainerait une diminution du niveau d'expression.

### **2.1.3. Les vecteurs rétroviraux.**

L'utilisation d'autres types de vecteurs présentent un intérêt, comparé aux vecteurs de type plasmidique. Les systèmes rétroviraux RCAS ou lentiviral présentent de nombreux avantages par rapport aux plasmides. Par exemple, les vecteurs lentiviraux sont intéressants, puisqu'ils sont intégratifs, ils permettent le maintien d'une expression forte, ils ne sont pas dilués au fur et à mesure, des nombreuses mitoses, ils présentent une meilleure durée d'expression et ils peuvent permettre de réaliser des expériences de traçage rétroviral.

Enfin, suivant le type d'expériences, que nous souhaitons effectuer en contexte de gain de fonction chez l'embryon de poulet, le choix du vecteur d'expression est important. D'ailleurs, dans le laboratoire, nous envisageons la mise au point d'un système d'expression chez l'embryon de poulet, basé sur les vecteurs lentiviraux, pour palier aux limites du système d'expression plasmidique. D'autre part, ces vecteurs pourront être utilisés, pour la mise au point d'expériences de perte de fonction avec des RNAi ou des shRNA (short hairpin RNA), chez l'embryon de poulet.

## **2.2. Les expériences en contexte de perte de fonction.**

### **2.2.1. Les limites du modèle de souris *Gata2*<sup>-/-</sup>.**

Les expériences effectuées chez l'embryon de souris *Gata2*<sup>-/-</sup> ont été difficiles et limitées aux stades E9.5 et E10.5, car l'inactivation du gène *Gata2* provoque la mort embryonnaire à E10.5, suite à des défauts sévères d'hématopoïèse. De plus, les embryons *Gata2*<sup>-/-</sup> sont plus petits et plus fragiles à manipuler, que les embryons sauvages. Ces inconvénients ont limité nos investigations et nous n'avons pas pu réaliser

une étude sur le devenir des interneurons V2 après le stade E10.5, en absence de Gata2. Par ailleurs, nous n'avons pas toujours observé les effets attendus, peut être à cause de l'éventuelle mise en place de mécanismes de compensation fonctionnelle. Nous pouvons supposer qu'en absence de Gata2, la différenciation terminale des interneurons V2 est affectée et que ce défaut de différenciation se répercuterait sur les cibles des V2. Pour résoudre ce problème, plusieurs solutions sont envisageables.

### **2.2.2. L'utilisation d'une stratégie Cre-lox, pour invalider Gata2 dans le système nerveux.**

Afin de contourner le problème de létalité de l'invalidation de Gata2 chez l'embryon de souris, nous avons envisagé l'utilisation d'une stratégie Cre-lox, à l'aide d'une lignée de souris Gata2 « floxé » et une lignée de souris transgéniques V2-Cre (expression de Cre recombinase est ciblée uniquement dans les progéniteurs neuronaux Gata2). Le croisement de ces 2 types de lignées permettra d'obtenir une invalidation du gène Gata2 à E9.5, uniquement dans le territoire p2 dans la moelle épinière embryonnaire. L'analyse de la fonction de Gata2 dans la moelle épinière, à des stades développementaux plus tardifs qu'E10.5, sera facilitée. Nous pouvons supposer que les embryons issus d'un tel croisement seraient viables et il serait alors intéressant de déterminer si l'absence ou le défaut de différenciation des interneurons V2 peut affecter le fonctionnement du circuit locomoteur.

### **2.2.3. L'inhibition de l'expression de Gata2 par RNAi.**

L'utilisation de la technique de l'ARN interférence (RNAi) chez l'embryon de poulet pourrait être expérimentée. En effet, nous pouvons envisager la mise au point d'un vecteur lentiviral permettant d'inhiber l'expression de Gata2 dans le tube neural d'embryon de poulet. Ainsi, nous pourrions déterminer plus en détail, l'effet de l'absence de la fonction de Gata2 sur la différenciation des interneurons V2. Les progéniteurs interneurons V2 pourraient être respécifiés en interneurons V1 ou en motoneurons ou être éliminés. Des études à des stades plus tardifs permettraient également de déterminer, en partie, si l'absence d'interneurons V2 ou l'altération de la

différenciation des interneurons V2 peut avoir des conséquences sur le développement des autres populations neuronales. Ce type d'approche présente de nombreux avantages, car la suppression de l'expression de Gata2 uniquement dans le tube neural n'affecterait pas le développement des autres tissus embryonnaires et des mécanismes de compensation fonctionnelle ne pourraient pas interférer sur le développement.

### **2.3. L'amélioration des marquages histochimiques.**

Nos analyses en contexte de perte et de gain de fonction ont nécessité l'étude de nombreux marqueurs tels que les inhibiteurs du cycle cellulaire, les facteurs de transcription impliqués dans l'établissement du patron d'expression dorsoventral comme, entre autres, Gli2, Gli3, Irx3, Nkx6.1, Mash1 et Ngn2.

Chez l'embryon de poulet, comme chez l'embryon de souris, nous avons réalisé de nombreuses études par la technique d'hybridation in situ. Cette technique présente de nombreux avantages car nous pouvons observer les éventuelles régulations au niveau transcriptionnel notamment. Cependant, l'utilisation de cette technique est assez lourde comparé aux immunomarquages.

Chez l'embryon de poulet, les immunomarquages ont parfois présenté quelques inconvénients, car certains anticorps fonctionnant parfaitement chez l'embryon de souris peuvent ne pas reconnaître la protéine de poulet. C'est notamment le cas pour les anticorps anti p57<sup>Kip2</sup> et anti p21<sup>Cip1</sup>, ce qui nous a limité dans l'étude de la fonction de Gata2 en rapport avec le cycle cellulaire. Inversement, certains anticorps spécifiques des protéines de poulet ne reconnaissent pas toujours les protéines murines. D'ailleurs, certains anticorps qui donnent de très bons résultats en culture, notamment les anticorps monoclonal anti Gata2, fonctionnent mal sur des coupes d'embryons de souris comme d'embryons de poulet.

D'autre part, l'étude des interneurons V2a et V2b, à l'aide d'immunomarquages a été compliqué, par la nécessité d'optimiser les paramètres de fixation des embryons. En effet, les anticorps anti Gata2, anti Gata3 et anti Chx10 sont sensibles au temps de fixation des embryons, qui doit être ajusté à la taille des embryons. Ainsi, nous avons adapté les temps de fixation des embryons de souris, suivant le stade de développement. La fixation a été optimisée par l'addition d'un agent de perméabilisation tel que le NP40.



Ces diverses améliorations ont permis d'utiliser de nombreux anticorps qui ne donnaient pas de résultats satisfaisants.

## **CONCLUSION & PERSPECTIVES**

---



## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Mon travail de thèse a porté sur l'étude fonctionnelle du gène *Gata2*, au cours de la neurogenèse de la partie ventrale de la moelle épinière embryonnaire. Les résultats de cette étude suggèrent que *Gata2* peut être considéré comme un gène de spécification.

Nous avons mis en évidence pour la première fois, une nouvelle fonction de *Gata2*, dans le système nerveux central. En effet, *Gata2* exerce un contrôle négatif sur la prolifération des progéniteurs neuraux, en induisant à lui seul, l'arrêt de la prolifération des progéniteurs, avec un effet cellulaire non-autonome qui est vraisemblablement médié par un ou plusieurs facteurs diffusibles. Cette induction de l'arrêt de la prolifération est associée à l'inhibition de l'intégralité de la voie Notch par *Gata2*. De plus, *Gata2* peut induire la sortie de cycle et de la différenciation neuronale, indépendamment d'une activité proneurale.

L'induction de la différenciation neuronale est liée à la fonction de gène de spécification de *Gata2*. Nous avons montré que *Gata2* joue un rôle majeur dans les mécanismes de spécification des interneurons V2, dans la moelle épinière ventrale embryonnaire. Nos expériences ont établi que *Gata2* contrôle la mise en place des interneurons V2, en inhibant le programme de différenciation de motoneurons, en modulant l'activation de la voie Shh. D'autre part, il participe activement à la divergence V2a/V2b, en favorisant la différenciation des interneurons V2b aux dépens de celle des V2a, par l'inhibition de la voie TGF $\beta$ /Activine. Cette dichotomie des interneurons V2 implique probablement un mécanisme d'inhibition latérale ou une division asymétrique, médié par l'interaction entre Delta4 et Notch. Enfin, nous avons mis en évidence que les interneurons V2a sont glutamatergiques alors que les V2b sont GABAergiques.

Cette étude a clairement mis en évidence la complexité des interactions génétiques entre *Gata2* et les différentes voies de signalisation impliquées dans la spécification neuronale dans la partie ventrale de la moelle épinière, et en particulier, au cours de la différenciation des interneurons V2.

Afin d'étendre notre étude, à la caractérisation des interneurons V2 et de leurs dérivés, dans la moelle épinière, à des stades de développement très tardifs et également

chez l'adulte, nous avons décidé d'établir le lignage des progéniteurs Gata2<sup>+</sup> dans la moelle épinière.

Pour obtenir ce lignage, nous avons adopté une stratégie Cre-Lox chez la souris. Nous avons généré des souris transgéniques (V2-Cre), dans lesquelles l'expression de Cre est ciblée dans les progéniteurs Gata2<sup>+</sup> de la moelle épinière. Des croisements avec des lignées rapportrices Rosa26LacZ ont permis de produire des animaux dans lesquels l'expression du gène rapporteur est activée dans les progéniteurs Gata2<sup>+</sup> et maintenue dans tous leurs dérivés. Ceci permettra de localiser les dérivés des progéniteurs Gata2<sup>+</sup>, au cours du développement et chez l'adulte, et de déterminer s'ils comprennent également des cellules gliales (astrocytes ou oligodendrocytes). Nous pouvons également envisager l'utilisation de ces lignées de souris transgéniques, pour la réalisation d'études fonctionnelles des interneurons V2, afin de déterminer si ces neurones sont intégrés au circuit locomoteur et mieux comprendre leur fonction dans la moelle épinière.

Enfin, l'ensemble des travaux sur le domaine p2 s'est révélé particulièrement intéressant pour mieux comprendre comment une même population de progéniteurs peut donner naissance à des neurones fonctionnellement différents.

## **BIBLIOGRAPHIE**

---



## Références bibliographiques

**Allan D.W., et Thor S.** (2003). Together at last: bHLH and LIM-HD regulators cooperate to specify motor neurons. *Neuron* 38, 675-677.

**Alvarez F.J., Jonas P.C., Sapir T., Hartley R., Berrocal M.C., Geiman E.J., Todd A.J., et Goulding M.** (2005). Postnatal phenotype and localization of spinal cord V1 derived interneurons. *J Comp Neurol* 493, 177-192.

**Andreazzoli M., Pannese M., et Boncinelli E.** (1997). Activating and repressing signals in head development: the role of Xotx1 and Xotx2. *Development (Cambridge, England)* 124, 1733-1743.

**Andres-Barquin P.J., Hernandez M.C., et Israel M.A.** (2000). Id genes in nervous system development. *Histol Histopathol* 15, 603-618.

**Appel B., et Eisen J.S.** (2003). Retinoids run rampant: multiple roles during spinal cord and motor neuron development. *Neuron* 40, 461-464.

**Arber S., Han B., Mendelsohn M., Smith M., Jessell T.M., et Sockanathan S.** (1999). Requirement for the homeobox gene Hb9 in the consolidation of motor neuron identity. *Neuron* 23, 659-674.

**Artavanis-Tsakonas S., Rand M.D., et Lake R.J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science (New York, NY)* 284, 770-776.

**Atchley W.R., et Fitch W.M.** (1995). Myc and Max: molecular evolution of a family of proto-oncogene products and their dimerization partner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10217-10221.

**Atchley W.R., et Fitch W.M.** (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 5172-5176.

**Bai C.B., Auerbach W., Lee J.S., Stephen D., et Joyner A.L.** (2002). Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway. *Development (Cambridge, England)* 129, 4753-4761.

**Bai C.B., Stephen D., et Joyner A.L.** (2004). All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Developmental cell* 6, 103-115.

**Bang A.G., Papalopulu N., Goulding M.D., et Kintner C.** (1999). Expression of Pax-3 in the lateral neural plate is dependent on a Wnt-mediated signal from posterior nonaxial mesoderm. *Developmental biology* 212, 366-380.

**Barembaum M., et Bronner-Fraser M.** (2005). Early steps in neural crest specification. *Seminars in cell & developmental biology* 16, 642-646.

**Barnfield P.C., Zhang X., Thanabalasingham V., Yoshida M., et Hui C.C.** (2005). Negative regulation of Gli1 and Gli2 activator function by Suppressor of fused through multiple mechanisms. *Differentiation* 73, 397-405.



- Barth K.A., Kishimoto Y., Rohr K.B., Seydler C., Schulte-Merker S., et Wilson S.W.** (1999). Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development (Cambridge, England)* *126*, 4977-4987.
- Battiste J., Helms A.W., Kim E.J., Savage T.K., Lagace D.C., Mandyam C.D., Eisch A.J., Miyoshi G., et Johnson J.E.** (2007). *Ascl1* defines sequentially generated lineage-restricted neuronal and oligodendrocyte precursor cells in the spinal cord. *Development (Cambridge, England)* *134*, 285-293.
- Bell E., Lumsden A., et Graham A.** (1999). Expression of GATA-2 in the developing avian rhombencephalon. *Mechanisms of development* *84*, 173-176.
- Bel-Vialar S., Itasaki N., et Krumlauf R.** (2002). Initiating Hox gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the HoxB genes in two distinct groups. *Development (Cambridge, England)* *129*, 5103-5115.
- Bertrand N., Castro D.S., et Guillemot F.** (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* *3*, 517-530.
- Bertrand N., Medevielle F., et Pituello F.** (2000). FGF signalling controls the timing of Pax6 activation in the neural tube. *Development (Cambridge, England)* *127*, 4837-4843.
- Besson A., Gurian-West M., Schmidt A., Hall A., et Roberts J.M.** (2004). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes & development* *18*, 862-876.
- Borycki A., Brown A.M., et Emerson C.P., Jr.** (2000). Shh and Wnt signaling pathways converge to control Gli gene activation in avian somites. *Development (Cambridge, England)* *127*, 2075-2087.
- Bottcher R.T., et Niehrs C.** (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine reviews* *26*, 63-77.
- Bouchard C., Thieke K., Maier A., Saffrich R., Hanley-Hyde J., Ansorge W., Reed S., Sicinski P., Bartek J., et Eilers M.** (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *The EMBO journal* *18*, 5321-5333.
- Brewster R., Mullor J.L., et Ruiz i Altaba A.** (2000). Gli2 functions in FGF signaling during antero-posterior patterning. *Development (Cambridge, England)* *127*, 4395-4405.
- Briscoe J., Chen Y., Jessell T.M., et Struhl G.** (2001). A hedgehog-insensitive form of patched provides evidence for direct long-range morphogen activity of sonic hedgehog in the neural tube. *Molecular cell* *7*, 1279-1291.
- Briscoe J., et Ericson J.** (1999). The specification of neuronal identity by graded Sonic Hedgehog signalling. *Seminars in cell & developmental biology* *10*, 353-362.
- Briscoe J., et Ericson J.** (2001). Specification of neuronal fates in the ventral neural tube. *Current opinion in neurobiology* *11*, 43-49.
- Briscoe J., Pierani A., Jessell T.M., et Ericson J.** (2000). A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* *101*, 435-445.

- Bronner-Fraser M.** (1995). Origin of the avian neural crest. *Stem cells* (Dayton, Ohio) *13*, 640-646.
- Cabrera C.V., et Alonso M.C.** (1991). Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *The EMBO journal* *10*, 2965-2973.
- Campos-Ortega J.A.** (1993). Mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* *24*, 1305-1327.
- Capdevila J., Tabin C., et Johnson R.L.** (1998). Control of dorsoventral somite patterning by Wnt-1 and beta-catenin. *Developmental biology* *193*, 182-194.
- Carthon B.C., Neumann C.A., Das M., Pawlyk B., Li T., Geng Y., et Sicinski P.** (2005). Genetic replacement of cyclin D1 function in mouse development by cyclin D2. *Molecular and cellular biology* *25*, 1081-1088.
- Caspary T., et Anderson K.V.** (2003). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nat Rev Neurosci* *4*, 289-297.
- Chang D.T., Lopez A., von Kessler D.P., Chiang C., Simandl B.K., Zhao R., Seldin M.F., Fallon J.F., et Beachy P.A.** (1994). Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development* (Cambridge, England) *120*, 3339-3353.
- Cheng M., Olivier P., Diehl J.A., Fero M., Roussel M.F., Roberts J.M., et Sherr C.J.** (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *The EMBO journal* *18*, 1571-1583.
- Chesnutt C., Burrus L.W., Brown A.M., et Niswander L.** (2004). Coordinate regulation of neural tube patterning and proliferation by TGFbeta and WNT activity. *Developmental biology* *274*, 334-347.
- Chiang C., Litingtung Y., Lee E., Young K.E., Corden J.L., Westphal H., et Beachy P.A.** (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* *383*, 407-413.
- Chizhikov V.V., et Millen K.J.** (2005). Roof plate-dependent patterning of the vertebrate dorsal central nervous system. *Developmental biology* *277*, 287-295.
- Colas J.F., et Schoenwolf G.C.** (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev Dyn* *221*, 117-145.
- Conlon R.A., et Rossant J.** (1992). Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Development* (Cambridge, England) *116*, 357-368.
- Coqueret O.** (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends in cell biology* *13*, 65-70.
- Crane J.F., et Trainor P.A.** (2006). Neural crest stem and progenitor cells. *Annual review of cell and developmental biology* *22*, 267-286.
- Craven S.E., Lim K.C., Ye W., Engel J.D., de Sauvage F., et Rosenthal A.** (2004). Gata2 specifies serotonergic neurons downstream of sonic hedgehog. *Development* (Cambridge, England) *131*, 1165-1173.

- Cremisi F., Philpott A., et Ohnuma S.** (2003). Cell cycle and cell fate interactions in neural development. *Current opinion in neurobiology* 13, 26-33.
- Dang C.V., Dolde C., Gillison M.L., et Kato G.J.** (1992). Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 599-602.
- Darken R.S., et Wilson P.A.** (2001). Axis induction by wnt signaling: Target promoter responsiveness regulates competence. *Developmental biology* 234, 42-54.
- De Strooper B., Annaert W., Cupers P., Saftig P., Craessaerts K., Mumm J.S., Schroeter E.H., Schrijvers V., Wolfe M.S., Ray W.J., Goate A., et Kopan R.** (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522.
- Diez del Corral R., Breitkreuz D.N., et Storey K.G.** (2002). Onset of neuronal differentiation is regulated by paraxial mesoderm and requires attenuation of FGF signalling. *Development (Cambridge, England)* 129, 1681-1691.
- Diez del Corral R., Olivera-Martinez I., Goriely A., Gale E., Maden M., et Storey K.** (2003). Opposing FGF and retinoid pathways control ventral neural pattern, neuronal differentiation, and segmentation during body axis extension. *Neuron* 40, 65-79.
- Diez del Corral R., et Storey K.G.** (2001). Markers in vertebrate neurogenesis. *Nat Rev Neurosci* 2, 835-839.
- Ding Y.Q., Yin J., Kania A., Zhao Z.Q., Johnson R.L., et Chen Z.F.** (2004). Lmx1b controls the differentiation and migration of the superficial dorsal horn neurons of the spinal cord. *Development (Cambridge, England)* 131, 3693-3703.
- Doe C.Q., et Technau G.M.** (1993). Identification and cell lineage of individual neural precursors in the *Drosophila* CNS. *Trends in neurosciences* 16, 510-514.
- Doniach T., et Musci T.J.** (1995). Induction of anteroposterior neural pattern in *Xenopus*: evidence for a quantitative mechanism. *Mechanisms of development* 53, 403-413.
- Dorsky R.I., Itoh M., Moon R.T., et Chitnis A.** (2003). Two tcf3 genes cooperate to pattern the zebrafish brain. *Development (Cambridge, England)* 130, 1937-1947.
- Dou C., Ye X., Stewart C., Lai E., et Li S.C.** (1997). TWH regulates the development of subsets of spinal cord neurons. *Neuron* 18, 539-551.
- Dyer M.A., et Cepko C.L.** (2001). Regulating proliferation during retinal development. *Nat Rev Neurosci* 2, 333-342.
- Echelard Y., Epstein D.J., St-Jacques B., Shen L., Mohler J., McMahon J.A., et McMahon A.P.** (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Edlund T., et Jessell T.M.** (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96, 211-224.

- Eggenchwiler J.T., Bulgakov O.V., Qin J., Li T., et Anderson K.V.** (2006). Mouse Rab23 regulates hedgehog signaling from smoothened to Gli proteins. *Developmental biology* 290, 1-12.
- Eggenchwiler J.T., Espinoza E., et Anderson K.V.** (2001). Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature* 412, 194-198.
- Ericson J., Briscoe J., Rashbass P., van Heyningen V., et Jessell T.M.** (1997a). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 62, 451-466.
- Ericson J., Morton S., Kawakami A., Roelink H., et Jessell T.M.** (1996). Two critical periods of Sonic Hedgehog signaling required for the specification of motor neuron identity. *Cell* 87, 661-673.
- Ericson J., Muhr J., Placzek M., Lints T., Jessell T.M., et 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.
- Ericson J., Rashbass P., Schedl A., Brenner-Morton S., Kawakami A., van Heyningen V., Jessell T.M., et Briscoe J.** (1997b). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90, 169-180.
- Erter C.E., Wilm T.P., Basler N., Wright C.V., et Solnica-Krezel L.** (2001). Wnt8 is required in lateral mesendodermal precursors for neural posteriorization in vivo. *Development (Cambridge, England)* 128, 3571-3583.
- Farah M.H., Olson J.M., Sucic H.B., Hume R.I., Tapscott S.J., et Turner D.L.** (2000). Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development (Cambridge, England)* 127, 693-702.
- Fior R., et Henrique D.** (2005). A novel hes5/hes6 circuitry of negative regulation controls Notch activity during neurogenesis. *Developmental biology* 281, 318-333.
- Fode C., Ma Q., Casarosa S., Ang S.L., Anderson D.J., et Guillemot F.** (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes & development* 14, 67-80.
- Fortini M.E.** (2002). Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nature reviews* 3, 673-684.
- Franco P.G., Paganelli A.R., Lopez S.L., et Carrasco A.E.** (1999). Functional association of retinoic acid and hedgehog signaling in *Xenopus* primary neurogenesis. *Development (Cambridge, England)* 126, 4257-4265.
- Frise E., Knoblich J.A., Younger-Shepherd S., Jan L.Y., et Jan Y.N.** (1996). The *Drosophila* Numb protein inhibits signaling of the Notch receptor during cell-cell interaction in sensory organ lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11925-11932.
- Fuccillo M., Joyner A.L., et Fishell G.** (2006). Morphogen to mitogen: the multiple roles of hedgehog signalling in vertebrate neural development. *Nat Rev Neurosci* 7, 772-783.

- Gammill L.S., et Bronner-Fraser M.** (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 4, 795-805.
- Garcia-Bellido A.** (1979). Genetic Analysis of the Achaete-Scute System of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 91, 491-520.
- Garcia-Campmany L., et Marti E.** (2007). The TGFbeta intracellular effector Smad3 regulates neuronal differentiation and cell fate specification in the developing spinal cord. *Development (Cambridge, England)* 134, 65-75.
- Gavalas A.** (2002). ArRAnging the hindbrain. *Trends in neurosciences* 25, 61-64.
- Gavalas A., et Krumlauf R.** (2000). Retinoid signalling and hindbrain patterning. *Current opinion in genetics & development* 10, 380-386.
- Glasgow S.M., Henke R.M., Macdonald R.J., Wright C.V., et Johnson J.E.** (2005). Ptf1a determines GABAergic over glutamatergic neuronal cell fate in the spinal cord dorsal horn. *Development (Cambridge, England)* 132, 5461-5469.
- Glinka A., Wu W., Delius H., Monaghan A.P., Blumenstock C., et Niehrs C.** (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357-362.
- Glinka A., Wu W., Onichtchouk D., Blumenstock C., et Niehrs C.** (1997). Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in *Xenopus*. *Nature* 389, 517-519.
- Godsave S.F., Koster C.H., Getahun A., Mathu M., Hooiveld M., van der Wees J., Hendriks J., et Durston A.J.** (1998). Graded retinoid responses in the developing hindbrain. *Dev Dyn* 213, 39-49.
- Gokhan S., Marin-Husstege M., Yung S.Y., Fontanez D., Casaccia-Bonnel P., et Mehler M.F.** (2005). Combinatorial profiles of oligodendrocyte-selective classes of transcriptional regulators differentially modulate myelin basic protein gene expression. *J Neurosci* 25, 8311-8321.
- Gomez Lahoz E., Liegeois N.J., Zhang P., Engelman J.A., Horner J., Silverman A., Burde R., Roussel M.F., Sherr C.J., Elledge S.J., et DePinho R.A.** (1999). Cyclin D- and E-dependent kinases and the p57(KIP2) inhibitor: cooperative interactions in vivo. *Molecular and cellular biology* 19, 353-363.
- Goridis C., et Rohrer H.** (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 3, 531-541.
- Gosgnach S., Lanuza G.M., Butt S.J., Saueressig H., Zhang Y., Velasquez T., Riethmacher D., Callaway E.M., Kiehn O., et Goulding M.** (2006). V1 spinal neurons regulate the speed of vertebrate locomotor outputs. *Nature* 440, 215-219.
- Gould A., Itasaki N., et Krumlauf R.** (1998). Initiation of rhombomeric Hoxb4 expression requires induction by somites and a retinoid pathway. *Neuron* 21, 39-51.
- Goulding M., Lanuza G., Sapir T., et Narayan S.** (2002). The formation of sensorimotor circuits. *Current opinion in neurobiology* 12, 508-515.

**Goulding M., et Pfaff S.L.** (2005). Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates. *Current opinion in neurobiology* 15, 14-20.

**Gratton M.O., Torban E., Jasmin S.B., Theriault F.M., German M.S., et Stifani S.** (2003). Hes6 promotes cortical neurogenesis and inhibits Hes1 transcription repression activity by multiple mechanisms. *Molecular and cellular biology* 23, 6922-6935.

**Gross M.K., Dottori M., et Goulding M.** (2002). Lbx1 specifies somatosensory association interneurons in the dorsal spinal cord. *Neuron* 34, 535-549.

**Groves A.K., George K.M., Tissier-Seta J.P., Engel J.D., Brunet J.F., et Anderson D.J.** (1995). Differential regulation of transcription factor gene expression and phenotypic markers in developing sympathetic neurons. *Development (Cambridge, England)* 121, 887-901.

**Gu Y., Hukriede N.A., et Fleming R.J.** (1995). Serrate expression can functionally replace Delta activity during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development (Cambridge, England)* 121, 855-865.

**Gui H., Li S., et Matise M.P.** (2007). A cell-autonomous requirement for Cip/Kip cyclin-kinase inhibitors in regulating neuronal cell cycle exit but not differentiation in the developing spinal cord. *Developmental biology* 301, 14-26.

**Guillemot F.** (1999). Vertebrate bHLH genes and the determination of neuronal fates. *Experimental cell research* 253, 357-364.

**Gutin G., Fernandes M., Palazzolo L., Paek H., Yu K., Ornitz D.M., McConnell S.K., et Hebert J.M.** (2006). FGF signalling generates ventral telencephalic cells independently of SHH. *Development (Cambridge, England)* 133, 2937-2946.

**Hashimoto H., Itoh M., Yamanaka Y., Yamashita S., Shimizu T., Solnica-Krezel L., Hibi M., et Hirano T.** (2000). Zebrafish Dkk1 functions in forebrain specification and axial mesendoderm formation. *Developmental biology* 217, 138-152.

**Hassan B.A., et Bellen H.J.** (2000). Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development? *Genes & development* 14, 1852-1865.

**Hatakeyama J., Tomita K., Inoue T., et Kageyama R.** (2001). Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development (Cambridge, England)* 128, 1313-1322.

**Helms A.W., Battiste J., Henke R.M., Nakada Y., Simplicio N., Guillemot F., et Johnson J.E.** (2005). Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons. *Development (Cambridge, England)* 132, 2709-2719.

**Helms A.W., et Johnson J.E.** (2003). Specification of dorsal spinal cord interneurons. *Current opinion in neurobiology* 13, 42-49.

**Herrup K., et Yang Y.** (2007). Cell cycle regulation in the postmitotic neuron: oxymoron or new biology? *Nat Rev Neurosci* 8, 368-378.

- Hiratochi M., Nagase H., Kuramochi Y., Koh C.S., Ohkawara T., et Nakayama K.** (2007). The Delta intracellular domain mediates TGF-beta/Activin signaling through binding to Smads and has an important bi-directional function in the Notch-Delta signaling pathway. *Nucleic Acids Res* 35, 912-922.
- Hoffmann I.** (2006). Protein kinases involved in mitotic spindle checkpoint regulation. Results and problems in cell differentiation 42, 93-109.
- Hollyday M.** (2001). Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *Int J Dev Neurosci* 19, 161-173.
- Hooper J.E., et Scott M.P.** (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nature reviews* 6, 306-317.
- Hu Y.F., Luscher B., Admon A., Mermod N., et Tjian R.** (1990). Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes & development* 4, 1741-1752.
- Huard J.M., Forster C.C., Carter M.L., Sicinski P., et Ross M.E.** (1999). Cerebellar histogenesis is disturbed in mice lacking cyclin D2. *Development (Cambridge, England)* 126, 1927-1935.
- Hui C.C., Slusarski D., Platt K.A., Holmgren R., et Joyner A.L.** (1994). Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Developmental biology* 162, 402-413.
- Huttner W.B., et Kosodo Y.** (2005). Symmetric versus asymmetric cell division during neurogenesis in the developing vertebrate central nervous system. *Current opinion in cell biology* 17, 648-657.
- Hynes M., Ye W., Wang K., Stone D., Murone M., Sauvage F., et Rosenthal A.** (2000). The seven-transmembrane receptor *smoothed cell-autonomously* induces multiple ventral cell types. *Nature neuroscience* 3, 41-46.
- Ingham P.W.** (2001). Hedgehog signaling: a tale of two lipids. *Science (New York, NY)* 294, 1879-1881.
- Inoue T., Hojo M., Bessho Y., Tano Y., Lee J.E., et Kageyama R.** (2002). *Math3* and *NeuroD* regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development (Cambridge, England)* 129, 831-842.
- Iso T., Kedes L., et Hamamori Y.** (2003). HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of cellular physiology* 194, 237-255.
- Jan Y.N., et Jan L.Y.** (1994). Neuronal cell fate specification in *Drosophila*. *Current opinion in neurobiology* 4, 8-13.
- Jessell T.M.** (2000). Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1, 20-29.
- Jessell T.M., et Dodd J.** (1990). Floor plate-derived signals and the control of neural cell pattern in vertebrates. *Harvey lectures* 86, 87-128.
- Jhas S., Ciura S., Belanger-Jasmin S., Dong Z., Llamosas E., Theriault F.M., Joachim K., Tang Y., Liu L., Liu J., et Stifani S.** (2006). *Hes6* inhibits astrocyte differentiation and promotes neurogenesis through different mechanisms. *J Neurosci* 26, 11061-11071.

- Jimenez F., et Modolell J.** (1993). Neural fate specification in *Drosophila*. *Current opinion in genetics & development* 3, 626-632.
- Johnson J.E., Birren S.J., Saito T., et Anderson D.J.** (1992). DNA binding and transcriptional regulatory activity of mammalian achaete-scute homologous (MASH) proteins revealed by interaction with a muscle-specific enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 3596-3600.
- Jonk L.J., de Jonge M.E., Vervaart J.M., Wissink S., et Kruijer W.** (1994). Isolation and developmental expression of retinoic-acid-induced genes. *Developmental biology* 161, 604-614.
- Justice N.J., et Jan Y.N.** (2002). Variations on the Notch pathway in neural development. *Current opinion in neurobiology* 12, 64-70.
- Kageyama R., et Ohtsuka T.** (1999). The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Res* 9, 179-188.
- Kageyama R., Ohtsuka T., Hatakeyama J., et Ohsawa R.** (2005). Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Experimental cell research* 306, 343-348.
- Kamnasaran D., et Guha A.** (2005). Expression of GATA6 in the human and mouse central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 160, 90-95.
- Kania A., Johnson R.L., et Jessell T.M.** (2000). Coordinate roles for LIM homeobox genes in directing the dorsoventral trajectory of motor axons in the vertebrate limb. *Cell* 102, 161-173.
- Karunaratne A., Hargrave M., Poh A., et Yamada T.** (2002). GATA proteins identify a novel ventral interneuron subclass in the developing chick spinal cord. *Developmental biology* 249, 30-43.
- Katoh M.** (2006). NUMB is a break of WNT-Notch signaling cycle. *Int J Mol Med* 18, 517-521.
- Kazanskaya O., Glinka A., et Niehrs C.** (2000). The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning. *Development (Cambridge, England)* 127, 4981-4992.
- Kidd S., Kelley M.R., et Young M.W.** (1986). Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Molecular and cellular biology* 6, 3094-3108.
- Kiecker C., et Lumsden A.** (2005). Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nat Rev Neurosci* 6, 553-564.
- Kiecker C., et Niehrs C.** (2001). A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)* 128, 4189-4201.
- Kiehn O.** (2006). Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci* 29, 279-306.
- Kim C.H., Oda T., Itoh M., Jiang D., Artinger K.B., Chandrasekharappa S.C., Driever W., et Chitnis A.B.** (2000). Repressor activity of *Headless/Tcf3* is essential for vertebrate head formation. *Nature* 407, 913-916.



**Kinzler K.W., et Vogelstein B.** (1990). The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Molecular and cellular biology* 10, 634-642.

**Kogerman P., Grimm T., Kogerman L., Krause D., Unden A.B., Sandstedt B., Toftgard R., et Zaphiropoulos P.G.** (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nature cell biology* 1, 312-319.

**Koyano-Nakagawa N., Kim J., Anderson D., et Kintner C.** (2000). Hes6 acts in a positive feedback loop with the neurogenins to promote neuronal differentiation. *Development (Cambridge, England)* 127, 4203-4216.

**Kuschel S., Ruther U., et Theil T.** (2003). A disrupted balance between Bmp/Wnt and Fgf signaling underlies the ventralization of the Gli3 mutant telencephalon. *Developmental biology* 260, 484-495.

**Lanuza G.M., Gosgnach S., Pierani A., Jessell T.M., et Goulding M.** (2004). Genetic identification of spinal interneurons that coordinate left-right locomotor activity necessary for walking movements. *Neuron* 42, 375-386.

**Lee J., Platt K.A., Censullo P., et Ruiz i Altaba A.** (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development (Cambridge, England)* 124, 2537-2552.

**Lee J.E.** (1997). Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Current opinion in neurobiology* 7, 13-20.

**Lee K.J., Dietrich P., et Jessell T.M.** (2000). Genetic ablation reveals that the roof plate is essential for dorsal interneuron specification. *Nature* 403, 734-740.

**Lee K.J., Mendelsohn M., et Jessell T.M.** (1998). Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *Genes & development* 12, 3394-3407.

**Lee S.K., Jurata L.W., Funahashi J., Ruiz E.C., et Pfaff S.L.** (2004). Analysis of embryonic motoneuron gene regulation: derepression of general activators function in concert with enhancer factors. *Development (Cambridge, England)* 131, 3295-3306.

**Lee S.K., Lee B., Ruiz E.C., et Pfaff S.L.** (2005). Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes & development* 19, 282-294.

**Lee S.K., et Pfaff S.L.** (2003). Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* 38, 731-745.

**Lei Q., Jeong Y., Misra K., Li S., Zelman A.K., Epstein D.J., et Matisse M.P.** (2006). Wnt signaling inhibitors regulate the transcriptional response to morphogenetic Shh-Gli signaling in the neural tube. *Developmental cell* 11, 325-337.

**Lei Q., Zelman A.K., Kuang E., Li S., et Matisse M.P.** (2004). Transduction of graded Hedgehog signaling by a combination of Gli2 and Gli3 activator functions in the developing spinal cord. *Development (Cambridge, England)* 131, 3593-3604.

- Lekven A.C., Thorpe C.J., Waxman J.S., et Moon R.T.** (2001). Zebrafish *wnt8* encodes two *wnt8* proteins on a bicistronic transcript and is required for mesoderm and neurectoderm patterning. *Developmental cell* 1, 103-114.
- Levine E.M., Close J., Fero M., Ostrovsky A., et Reh T.A.** (2000). p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. *Developmental biology* 219, 299-314.
- Li S., Misra K., Matise M.P., et Xiang M.** (2005). *Foxn4* acts synergistically with *Mash1* to specify subtype identity of V2 interneurons in the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10688-10693.
- Li W.C., Higashijima S., Parry D.M., Roberts A., et Soffe S.R.** (2004). Primitive roles for inhibitory interneurons in developing frog spinal cord. *J Neurosci* 24, 5840-5848.
- Liem K.F., Jr., Jessell T.M., et Briscoe J.** (2000). Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development (Cambridge, England)* 127, 4855-4866.
- Lin J.H., Saito T., Anderson D.J., Lance-Jones C., Jessell T.M., et Arber S.** (1998). Functionally related motor neuron pool and muscle sensory afferent subtypes defined by coordinate ETS gene expression. *Cell* 95, 393-407.
- Litingtung Y., et Chiang C.** (2000). Specification of ventral neuron types is mediated by an antagonistic interaction between *Shh* and *Gli3*. *Nature neuroscience* 3, 979-985.
- Liu A., et Niswander L.A.** (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* 6, 945-954.
- Liu J.P., Laufer E., et Jessell T.M.** (2001). Assigning the positional identity of spinal motor neurons: rostrocaudal patterning of *Hox-c* expression by FGFs, *Gdf11*, and retinoids. *Neuron* 32, 997-1012.
- Lo L., Dormand E., Greenwood A., et Anderson D.J.** (2002). Comparison of the generic neuronal differentiation and neuron subtype specification functions of mammalian *achaete-scute* and *atonal* homologs in cultured neural progenitor cells. *Development (Cambridge, England)* 129, 1553-1567.
- Lobjois V., Benazeraf B., Bertrand N., Medevielle F., et Pituello F.** (2004). Specific regulation of cyclins D1 and D2 by FGF and *Shh* signaling coordinates cell cycle progression, patterning, and differentiation during early steps of spinal cord development. *Developmental biology* 273, 195-209.
- Lucas M.E., Muller F., Rudiger R., Henion P.D., et Rohrer H.** (2006). The bHLH transcription factor *hand2* is essential for noradrenergic differentiation of sympathetic neurons. *Development (Cambridge, England)* 133, 4015-4024.
- Lukas J., Bartkova J., et Bartek J.** (1996). Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Molecular and cellular biology* 16, 6917-6925.
- Lum L., et Beachy P.A.** (2004). The Hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science (New York, NY)* 304, 1755-1759.

- Lum L., Zhang C., Oh S., Mann R.K., von Kessler D.P., Taipale J., Weis-Garcia F., Gong R., Wang B., et Beachy P.A.** (2003). Hedgehog signal transduction via Smoothed association with a cytoplasmic complex scaffolded by the atypical kinesin, Costal-2. *Molecular cell* 12, 1261-1274.
- Lupo G., Harris W.A., et Lewis K.E.** (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7, 103-114.
- Maden M.** (1999). Heads or tails? Retinoic acid will decide. *Bioessays* 21, 809-812.
- Maden M.** (2000). The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *The Proceedings of the Nutrition Society* 59, 65-73.
- Maden M.** (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3, 843-853.
- Maden M.** (2006). Retinoids and spinal cord development. *J Neurobiol* 66, 726-738.
- Malumbres M., et Barbacid M.** (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* 30, 630-641.
- Marshall H., Nonchev S., Sham M.H., Muchamore I., Lumsden A., et Krumlauf R.** (1992). Retinoic acid alters hindbrain Hox code and induces transformation of rhombomeres 2/3 into a 4/5 identity. *Nature* 360, 737-741.
- Marti E., et Bovolenta P.** (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends in neurosciences* 25, 89-96.
- Marti E., Bumcrot D.A., Takada R., et McMahon A.P.** (1995). Requirement of 19K form of Sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* 375, 322-325.
- Marti E., Takada R., Bumcrot D.A., Sasaki H., et McMahon A.P.** (1995). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* 121, 2537-2547.
- Massague J., Seoane J., et Wotton D.** (2005). Smad transcription factors. *Genes & development* 19, 2783-2810.
- Masuda S., Kumano K., Shimizu K., Imai Y., Kurokawa M., Ogawa S., Miyagishi M., Taira K., Hirai H., et Chiba S.** (2005). Notch1 oncoprotein antagonizes TGF-beta/Smad-mediated cell growth suppression via sequestration of coactivator p300. *Cancer Sci* 96, 274-282.
- Mathis L., Kulesa P.M., et Fraser S.E.** (2001). FGF receptor signalling is required to maintain neural progenitors during Hensen's node progression. *Nature cell biology* 3, 559-566.
- Matise M.P.** (2007). Order in the Classroom: Graded Responses to Instructive Hh Signaling in the CNS. *Cell Cycle* 6.
- Matise M.P., Epstein D.J., Park H.L., Platt K.A., et Joyner A.L.** (1998). Gli2 is required for induction of floor plate and adjacent cells, but not most ventral neurons in the mouse central nervous system. *Development (Cambridge, England)* 125, 2759-2770.

- Matsushime H., Quelle D.E., Shurtleff S.A., Shibuya M., Sherr C.J., et Kato J.Y.** (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* 14, 2066-2076.
- McGrew L.L., Hoppler S., et Moon R.T.** (1997). Wnt and FGF pathways cooperatively pattern anteroposterior neural ectoderm in *Xenopus*. *Mechanisms of development* 69, 105-114.
- McGrew L.L., Lai C.J., et Moon R.T.** (1995). Specification of the anteroposterior neural axis through synergistic interaction of the Wnt signaling cascade with noggin and follistatin. *Developmental biology* 172, 337-342.
- Mizuguchi R., Kriks S., Cordes R., Gossler A., Ma Q., et Goulding M.** (2006). *Ascl1* and *Gsh1/2* control inhibitory and excitatory cell fate in spinal sensory interneurons. *Nature neuroscience* 9, 770-778.
- Mizuguchi R., Sugimori M., Takebayashi H., Kosako H., Nagao M., Yoshida S., Nabeshima Y., Shimamura K., et Nakafuku M.** (2001). Combinatorial roles of *olig2* and *neurogenin2* in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31, 757-771.
- Motoyama J., Milenkovic L., Iwama M., Shikata Y., Scott M.P., et Hui C.C.** (2003). Differential requirement for *Gli2* and *Gli3* in ventral neural cell fate specification. *Developmental biology* 259, 150-161.
- Muhr J., Graziano E., Wilson S., Jessell T.M., et Edlund T.** (1999). Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos. *Neuron* 23, 689-702.
- Mukhopadhyay M., Shtrom S., Rodriguez-Esteban C., Chen L., Tsukui T., Gomer L., Dorward D.W., Glinka A., Grinberg A., Huang S.P., Niehrs C., Belmonte J.C., et Westphal H.** (2001). *Dickkopf1* is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Developmental cell* 1, 423-434.
- Muller T., Brohmann H., Pierani A., Heppenstall P.A., Lewin G.R., Jessell T.M., et Birchmeier C.** (2002). The homeodomain factor *lhx1* distinguishes two major programs of neuronal differentiation in the dorsal spinal cord. *Neuron* 34, 551-562.
- Muroyama Y., Fujihara M., Ikeya M., Kondoh H., et Takada S.** (2002). Wnt signaling plays an essential role in neuronal specification of the dorsal spinal cord. *Genes & development* 16, 548-553.
- Murre C., Bain G., van Dijk M.A., Engel I., Furnari B.A., Massari M.E., Matthews J.R., Quong M.W., Rivera R.R., et Stuiver M.H.** (1994). Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta* 1218, 129-135.
- Murre C., McCaw P.S., et Baltimore D.** (1989a). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.
- Murre C., McCaw P.S., Vaessin H., Caudy M., Jan L.Y., Jan Y.N., Cabrera C.V., Buskin J.N., Hauschka S.D., Lassar A.B., et et al.** (1989b). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544.
- Nardelli J., Thiesson D., Fujiwara Y., Tsai F.Y., et Orkin S.H.** (1999). Expression and genetic interaction of transcription factors *GATA-2* and *GATA-3* during development of the mouse central nervous system. *Developmental biology* 210, 305-321.

**Nguyen L., Besson A., Heng J.I., Schuurmans C., Teboul L., Parras C., Philpott A., Roberts J.M., et Guillemot F.** (2006). p27kip1 independently promotes neuronal differentiation and migration in the cerebral cortex. *Genes & development* 20, 1511-1524.

**Nguyen L., Besson A., Roberts J.M., et Guillemot F.** (2006). Coupling cell cycle exit, neuronal differentiation and migration in cortical neurogenesis. *Cell Cycle* 5, 2314-2318.

**Nguyen V., Chokas A.L., Stecca B., et Altaba A.R.** (2005). Cooperative requirement of the Gli proteins in neurogenesis. *Development (Cambridge, England)* 132, 3267-3279.

**Nguyen V.H., Trout J., Connors S.A., Andermann P., Weinberg E., et Mullins M.C.** (2000). Dorsal and intermediate neuronal cell types of the spinal cord are established by a BMP signaling pathway. *Development (Cambridge, England)* 127, 1209-1220.

**Niederreither K., McCaffery P., Drager U.C., Chambon P., et Dolle P.** (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mechanisms of development* 62, 67-78.

**Niederreither K., Vermot J., Schuhbauer B., Chambon P., et Dolle P.** (2000). Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development (Cambridge, England)* 127, 75-85.

**Nordstrom U., Jessell T.M., et Edlund T.** (2002). Progressive induction of caudal neural character by graded Wnt signaling. *Nature neuroscience* 5, 525-532.

**Novitsch B.G., Chen A.I., et Jessell T.M.** (2001). Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* 31, 773-789.

**Novitsch B.G., Wichterle H., Jessell T.M., et Sockanathan S.** (2003). A requirement for retinoic acid-mediated transcriptional activation in ventral neural patterning and motor neuron specification. *Neuron* 40, 81-95.

**Ohnuma S., et Harris W.A.** (2003). Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* 40, 199-208.

**Ohnuma S., Hopper S., Wang K.C., Philpott A., et Harris W.A.** (2002). Co-ordinating retinal histogenesis: early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. *Development (Cambridge, England)* 129, 2435-2446.

**Ohnuma S., Philpott A., et Harris W.A.** (2001). Cell cycle and cell fate in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 11, 66-73.

**Orkin C., Stebbing J., Nelson M., Bower M., Johnson M., Mandalia S., Jones R., Moyle G., Fisher M., et Gazzard B.** (2005). A randomized study comparing a three- and four-drug HAART regimen in first-line therapy (QUAD study). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 55, 246-251.

**Papalopulu N., et Kintner C.** (1996). A posteriorising factor, retinoic acid, reveals that anteroposterior patterning controls the timing of neuronal differentiation in *Xenopus* neuroectoderm. *Development (Cambridge, England)* 122, 3409-3418.

**Park H.C., Mehta A., Richardson J.S., et Appel B.** (2002). olig2 is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Developmental biology* 248, 356-368.

- Park H.L., Bai C., Platt K.A., Matise M.P., Beeghly A., Hui C.C., Nakashima M., et Joyner A.L.** (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development (Cambridge, England)* 127, 1593-1605.
- Parras C.M., Schuurmans C., Scardigli R., Kim J., Anderson D.J., et Guillemot F.** (2002). Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes & development* 16, 324-338.
- Patient R.K., et McGhee J.D.** (2002). The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Current opinion in genetics & development* 12, 416-422.
- Patten I., et Placzek M.** (2002). Opponent activities of Shh and BMP signaling during floor plate induction in vivo. *Curr Biol* 12, 47-52.
- Pattyn A., Simplicio N., van Doorninck J.H., Goridis C., Guillemot F., et Brunet J.F.** (2004). Ascl1/Mash1 is required for the development of central serotonergic neurons. *Nature neuroscience* 7, 589-595.
- Peng C.Y., Yajima H., Burns C.E., Zon L.I., Sisodia S.S., Pfaff S.L., et Sharma K.** (2007). Notch and MAML signaling drives Scl-dependent interneuron diversity in the spinal cord. *Neuron* 53, 813-827.
- Persons D.A., Allay J.A., Allay E.R., Ashmun R.A., Orlic D., Jane S.M., Cunningham J.M., et Nienhuis A.W.** (1999). Enforced expression of the GATA-2 transcription factor blocks normal hematopoiesis. *Blood* 93, 488-499.
- Persson M., Stamatakis D., te Welscher P., Andersson E., Bose J., Ruther U., Ericson J., et Briscoe J.** (2002). Dorsal-ventral patterning of the spinal cord requires Gli3 transcriptional repressor activity. *Genes & development* 16, 2865-2878.
- Pfaff S.L., Mendelsohn M., Stewart C.L., Edlund T., et Jessell T.M.** (1996). Requirement for LIM homeobox gene Isl1 in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84, 309-320.
- Pierani A., Brenner-Morton S., Chiang C., et Jessell T.M.** (1999). A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97, 903-915.
- Pillai A., Mansouri A., Behringer R., Westphal H., et Goulding M.** (2007). Lhx1 and Lhx5 maintain the inhibitory-neurotransmitter status of interneurons in the dorsal spinal cord. *Development (Cambridge, England)* 134, 357-366.
- Placzek M.** (1995). The role of the notochord and floor plate in inductive interactions. *Current opinion in genetics & development* 5, 499-506.
- Portin P.** (2002). General outlines of the molecular genetics of the Notch signalling pathway in *Drosophila melanogaster*: a review. *Hereditas* 136, 89-96.
- Qian Y., Shirasawa S., Chen C.L., Cheng L., et Ma Q.** (2002). Proper development of relay somatic sensory neurons and D2/D4 interneurons requires homeobox genes Rnx/Tlx-3 and Tlx-1. *Genes & development* 16, 1220-1233.

**Rhind N., et Russell P.** (2001). Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints. *Molecular and cellular biology* 21, 1499-1508.

**Riobo N.A., et Manning D.R.** (2007). Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs. *Biochem J* 403, 369-379.

**Roegiers F., et Jan Y.N.** (2004). Asymmetric cell division. *Current opinion in cell biology* 16, 195-205.

**Roelink H., Augsburger A., Heemskerk J., Korzh V., Norlin S., Ruiz i Altaba A., Tanabe Y., Placzek M., Edlund T., Jessell T.M., et et al.** (1994). Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-775.

**Roelink H., Porter J.A., Chiang C., Tanabe Y., Chang D.T., Beachy P.A., et Jessell T.M.** (1995). Floor plate and motor neuron induction by different concentrations of the amino-terminal cleavage product of sonic hedgehog autoproteolysis. *Cell* 81, 445-455.

**Ross S.E., Greenberg M.E., et Stiles C.D.** (2003). Basic helix-loop-helix factors in cortical development. *Neuron* 39, 13-25.

**Rowitch D.H.** (2004). Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci* 5, 409-419.

**Ruiz i Altaba A.** (1998). Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development (Cambridge, England)* 125, 2203-2212.

**Ruiz i Altaba A.** (1999). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development (Cambridge, England)* 126, 3205-3216.

**Ruiz i Altaba A., Palma V., et Dahmane N.** (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* 3, 24-33.

**Ruiz i Altaba A., Placzek M., Baldassare M., Dodd J., et Jessell T.M.** (1995). Early stages of notochord and floor plate development in the chick embryo defined by normal and induced expression of HNF-3 beta. *Developmental biology* 170, 299-313.

**Sander M., Paydar S., Ericson J., Briscoe J., Berber E., German M., Jessell T.M., et Rubenstein J.L.** (2000). Ventral neural patterning by Nkx homeobox genes: Nkx6.1 controls somatic motor neuron and ventral interneuron fates. *Genes & development* 14, 2134-2139.

**Sapir T., Geiman E.J., Wang Z., Velasquez T., Mitsui S., Yoshihara Y., Frank E., Alvarez F.J., et Goulding M.** (2004). Pax6 and engrailed 1 regulate two distinct aspects of renshaw cell development. *J Neurosci* 24, 1255-1264.

**Sasaki H., Hui C., Nakafuku M., et Kondoh H.** (1997). A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development (Cambridge, England)* 124, 1313-1322.

**Sasaki H., Nishizaki Y., Hui C., Nakafuku M., et Kondoh H.** (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development (Cambridge, England)* 126, 3915-3924.

- Sharma K., Sheng H.Z., Lettieri K., Li H., Karavanov A., Potter S., Westphal H., et Pfaff S.L.** (1998). LIM homeodomain factors Lhx3 and Lhx4 assign subtype identities for motor neurons. *Cell* 95, 817-828.
- Sicinski P., Donaher J.L., Parker S.B., Li T., Fazeli A., Gardner H., Haslam S.Z., Bronson R.T., Elledge S.J., et Weinberg R.A.** (1995). Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82, 621-630.
- Simic P., et Vukicevic S.** (2007). Bone morphogenetic proteins: from developmental signals to tissue regeneration. Conference on bone morphogenetic proteins. *EMBO Rep* 8, 327-331.
- Smith E., Hargrave M., Yamada T., Begley C.G., et Little M.H.** (2002). Coexpression of SCL and GATA3 in the V2 interneurons of the developing mouse spinal cord. *Dev Dyn* 224, 231-237.
- Smith J.L., et Schoenwolf G.C.** (1997). Neurulation: coming to closure. *Trends in neurosciences* 20, 510-517.
- Sockanathan S., Perlmann T., et Jessell T.M.** (2003). Retinoid receptor signaling in postmitotic motor neurons regulates rostrocaudal positional identity and axonal projection pattern. *Neuron* 40, 97-111.
- Stark G.R., et Taylor W.R.** (2006). Control of the G2/M transition. *Molecular biotechnology* 32, 227-248.
- Storey K.G., Goriely A., Sargent C.M., Brown J.M., Burns H.D., Abud H.M., et Heath J.K.** (1998). Early posterior neural tissue is induced by FGF in the chick embryo. *Development (Cambridge, England)* 125, 473-484.
- Struhl G., et Greenwald I.** (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-525.
- Sugimori M., Nagao M., Bertrand N., Parras C.M., Guillemot F., et Nakafuku M.** (2007). Combinatorial actions of patterning and HLH transcription factors in the spatiotemporal control of neurogenesis and gliogenesis in the developing spinal cord. *Development (Cambridge, England)* 134, 1617-1629.
- Sun X.H., et Baltimore D.** (1991). An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers. *Cell* 64, 459-470.
- Sun Y., Lowther W., Kato K., Bianco C., Kenney N., Strizzi L., Raafat D., Hirota M., Khan N.I., Bargo S., Jones B., Salomon D., et Callahan R.** (2005). Notch4 intracellular domain binding to Smad3 and inhibition of the TGF-beta signaling. *Oncogene* 24, 5365-5374.
- Swanson H.I., Chan W.K., et Bradfield C.A.** (1995). DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem* 270, 26292-26302.
- Swindell E.C., Thaller C., Sockanathan S., Petkovich M., Jessell T.M., et Eichele G.** (1999). Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Developmental biology* 216, 282-296.
- Takebayashi H., Nabeshima Y., Yoshida S., Chisaka O., Ikenaka K., et Nabeshima Y.** (2002). The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol* 12, 1157-1163.



**Tanabe Y., William C., et Jessell T.M.** (1998). Specification of motor neuron identity by the MNR2 homeodomain protein. *Cell* 95, 67-80.

**Thaler J., Harrison K., Sharma K., Lettieri K., Kehrl J., et Pfaff S.L.** (1999). Active suppression of interneuron programs within developing motor neurons revealed by analysis of homeodomain factor HB9. *Neuron* 23, 675-687.

**Thomas U., Speicher S.A., et Knust E.** (1991). The *Drosophila* gene *Serrate* encodes an EGF-like transmembrane protein with a complex expression pattern in embryos and wing discs. *Development (Cambridge, England)* 111, 749-761.

**Thompson J.D., Higgins D.G., et Gibson T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

**Thor S., Andersson S.G., Tomlinson A., et Thomas J.B.** (1999). A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* 397, 76-80.

**Timmer J.R., Wang C., et Niswander L.** (2002). BMP signaling patterns the dorsal and intermediate neural tube via regulation of homeobox and helix-loop-helix transcription factors. *Development (Cambridge, England)* 129, 2459-2472.

**Tsai F.Y., Keller G., Kuo F.C., Weiss M., Chen J., Rosenblatt M., Alt F.W., et Orkin S.H.** (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.

**Tsai F.Y., et Orkin S.H.** (1997). Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood* 89, 3636-3643.

**Tsarovina K., Pattyn A., Stubbusch J., Muller F., van der Wees J., Schneider C., Brunet J.F., et Rohrer H.** (2004). Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development. *Development (Cambridge, England)* 131, 4775-4786.

**Tsuchida T., Ensini M., Morton S.B., Baldassare M., Edlund T., Jessell T.M., et Pfaff S.L.** (1994). Topographic organization of embryonic motor neurons defined by expression of LIM homeobox genes. *Cell* 79, 957-970.

**Tzeng S.F.** (2003). Inhibitors of DNA binding in neural cell proliferation and differentiation. *Neurochem Res* 28, 45-52.

**Vallstedt A., Muhr J., Pattyn A., Pierani A., Mendelsohn M., Sander M., Jessell T.M., et Ericson J.** (2001). Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneuron specification. *Neuron* 31, 743-755.

**van Straaten H.W., Hekking J.W., Thors F., Wiertz-Hoessels E.L., et Drukker J.** (1985). Induction of an additional floor plate in the neural tube. *Acta morphologica Neerlandico-Scandinavica* 23, 91-97.

- van Straaten H.W., Thors F., Wiertz-Hoessels L., Hekking J., et Drukker J.** (1985). Effect of a notochordal implant on the early morphogenesis of the neural tube and neuroblasts: histometrical and histological results. *Developmental biology* 110, 247-254.
- Vidal A., et Koff A.** (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247, 1-15.
- Villares R., et Cabrera C.V.** (1987). The achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to myc. *Cell* 50, 415-424.
- Voronova A., et Baltimore D.** (1990). Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 4722-4726.
- Watterson R.L., Goodheart C.R., et Lindberg G.** (1955). The influence of adjacent structures upon the shape of the neural tube and neural plate of chick embryos. *The Anatomical record* 122, 539-559.
- Wegner M.** (2001). Expression of transcription factors during oligodendroglial development. *Microscopy research and technique* 52, 746-752.
- Wharton K.A., Johansen K.M., Xu T., et Artavanis-Tsakonas S.** (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 567-581.
- Wianny F., Real F.X., Mummery C.L., Van Rooijen M., Lahti J., Samarut J., et Savatier P.** (1998). G1-phase regulators, cyclin D1, cyclin D2, and cyclin D3: up-regulation at gastrulation and dynamic expression during neurulation. *Dev Dyn* 212, 49-62.
- Wijgerde M., McMahon J.A., Rule M., et McMahon A.P.** (2002). A direct requirement for Hedgehog signaling for normal specification of all ventral progenitor domains in the presumptive mammalian spinal cord. *Genes & development* 16, 2849-2864.
- Wildner H., Muller T., Cho S.H., Brohl D., Cepko C.L., Guillemot F., et Birchmeier C.** (2006). dILA neurons in the dorsal spinal cord are the product of terminal and non-terminal asymmetric progenitor cell divisions, and require Mash1 for their development. *Development (Cambridge, England)* 133, 2105-2113.
- William C.M., Tanabe Y., et Jessell T.M.** (2003). Regulation of motor neuron subtype identity by repressor activity of Mnx class homeodomain proteins. *Development (Cambridge, England)* 130, 1523-1536.
- Wilson L., Gale E., Chambers D., et Maden M.** (2004). Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. *Developmental biology* 269, 433-446.
- Wilson L., et Maden M.** (2005). The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Developmental biology* 282, 1-13.
- Wine-Lee L., Ahn K.J., Richardson R.D., Mishina Y., Lyons K.M., et Crenshaw E.B., 3rd** (2004). Signaling through BMP type 1 receptors is required for development of interneuron cell types in the dorsal spinal cord. *Development (Cambridge, England)* 131, 5393-5403.

**Wodarz A., et Huttner W.B.** (2003). Asymmetric cell division during neurogenesis in *Drosophila* and vertebrates. *Mechanisms of development* 120, 1297-1309.

**Yang X., Tomita T., Wines-Samuelson M., Beglopoulos V., Tansey M.G., Kopan R., et Shen J.** (2006). Notch1 signaling influences v2 interneuron and motor neuron development in the spinal cord. *Dev Neurosci* 28, 102-117.

**Zetterberg A., Larsson O., et Wiman K.G.** (1995). What is the restriction point? *Current opinion in cell biology* 7, 835-842.

**Zhao M., Qiao M., Harris S.E., Chen D., Oyajobi B.O., et Mundy G.R.** (2006). The zinc finger transcription factor Gli2 mediates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts in response to hedgehog signaling. *Molecular and cellular biology* 26, 6197-6208.

**Zhou Y., Yamamoto M., et Engel J.D.** (2000). GATA2 is required for the generation of V2 interneurons. *Development (Cambridge, England)* 127, 3829-3838.



**Titre :**

*Étude fonctionnelle du gène Gata2 au cours de la neurogenèse dans la moelle épinière ventrale embryonnaire.*

**Résumé :**

Notre projet porte sur l'étude fonctionnelle du facteur de transcription GATA2 qui contrôle la mise en place de certaines populations neuronales. Mon travail de thèse est basé sur l'étude de sa fonction dans la moelle épinière. Dans la moelle épinière ventrale embryonnaire, les motoneurons et 4 classes d'interneurones V0, V1, V2 et V3 sont générés dans des territoires distincts. Les V2 sont spécifiés dans un territoire adjacent à celui des motoneurons et sont subdivisés en V2a et V2b. Notre but est de déterminer le rôle de Gata2 durant la spécification des V2 et son influence sur la prolifération des progéniteurs neuraux.

Par une approche de perte et gain de fonction, nous avons montré que :

1. Gata2 inhibe la prolifération des progéniteurs neuraux avec un effet cellulaire-non autonome, en induisant un inhibiteur du cycle et en réprimant la voie Notch. Ce contrôle peut être découplé de la différenciation neuronale et ne nécessite pas d'activité proneurale.

2. Gata2 joue favorise l'émergence des V2 et réprime la différenciation des motoneurons, par la modulation des voies Shh et TGF- $\beta$ . Gata2 participe à la dichotomie des V2 car il favorise la différenciation des V2b et inhibe celle des V2a. Nous avons montré que les V2a sont glutamatergiques et les V2b sont GABAergiques.

Cette étude a mis en évidence la complexité des mécanismes moléculaires à l'origine de la diversité neuronale.

**Mots-clés :**

Gata2, neurogenèse, interneurones V2, spécification, différenciation neuronale, moelle épinière ventrale embryonnaire.

**Title:**

*Functional study of the Gata2 gene during neurogenesis in the embryonic ventral spinal cord.*

**Abstract:**

Our project is dedicated to the functional analysis of the transcription factor GATA2, which is involved in the specification of several neuronal populations in the nervous system. My work was mainly focused on the study of Gata2 function during the neurogenesis in the embryonic spinal cord.

In the ventral spinal cord, motor neurons and 4 types of interneurons (V0, V1, V2 and V3) are generated in distinct territories. V2 interneurons are specified in a territory close to motor neurons and are subdivided into V2a and V2b. Our aims were to identify the role of Gata2 during V2 interneuron specification and to determine its influence on the proliferation of the neuronal precursor cells.

By loss- and gain-of-function experiments, we have shown that:

1. Gata2 inhibits the proliferation of neuronal precursor cells, by inhibiting the cell cycle and by repressing the Notch pathway. This control can be uncoupled from neuronal differentiation and does not require a proneural activity.

2. Gata2 promotes V2 differentiation and represses motor neuron differentiation by interfering with Shh and TGF- $\beta$  pathways. In addition, Gata2 participates in the V2 dichotomy since it promotes V2b, but inhibits V2a, differentiation. Moreover, we have shown that V2a are glutamatergics whereas V2b are GABAergics.

This study has contributed to highlight the complexity of the molecular mechanisms which participate in the amplification of the diversity of neuronal populations.

**Key words:**

Gata2, neurogenesis, V2 interneurons, specification, neuronal differentiation, embryonic ventral spinal cord.

**Auteur:**

FRANCIUS Cédric

**Intitulé et adresse du laboratoire :**

CNRS UMR7091 – Université Pierre & Marie Curie – LGN –  
Equipe « Développement neuronal et cellules souches »  
83, bld de l'Hôpital – 75013 PARIS.

**Année:**

2006/2007