



Etude des mécanismes impliqués dans la mise en place et le contrôle de l'expression du gène neurogénine 3 dans le système nerveux central et le pancréas.

Aline Guerci

► To cite this version:

Aline Guerci. Etude des mécanismes impliqués dans la mise en place et le contrôle de l'expression du gène neurogénine 3 dans le système nerveux central et le pancréas.. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris Sud - Paris XI, 2006. Français. NNT: . tel-00466806

HAL Id: tel-00466806

<https://theses.hal.science/tel-00466806>

Submitted on 24 Mar 2010

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.

Année 2006

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□

THESE

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris XI

Discipline : Biologie moléculaire, développement, endocrinologie.

Ecole doctorale : Signalisations Cellulaires, Endocrinologie, Neurosciences et Reproduction

Présentée et soutenue publiquement
par

Aline GUERCI

Le 21 Décembre 2006

Etude des mécanismes impliqués dans la mise en place et le contrôle
de l'expression du gène neurogénine 3
dans le système nerveux central et le pancréas

Directeur de thèse : Dr Jacques Mallet

Co-directeur de thèse: Dr Philippe Ravassard

Pr. Maurice Wegnez	Président
Dr. Silvia Cereghini	Rapporteur
Dr. Gérard Gradwohl	Rapporteur
Pr Martin Catala	Examineur
Dr. Philippe Ravassard	Invité
Dr Jacques Mallet	Directeur de thèse

*Ce travail de Thèse a été effectué au sein de l'UMR 7091
dans le Laboratoire de Génétique Moléculaire de la Neurotransmission et des
Processus Neurodégénératifs*



sur le site de l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière (bâtiment CERVl)

Année 2006

N° attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□

THESE

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris XI

Discipline : Biologie moléculaire, développement, endocrinologie.

Ecole doctorale : Signalisations Cellulaires, Endocrinologie, Neurosciences et Reproduction

Présentée et soutenue publiquement
par

Aline GUERCI

Le 21 Décembre 2006

Etude des mécanismes impliqués dans la mise en place et le contrôle
de l'expression du gène neurogénine 3
dans le système nerveux central et le pancréas

Directeur de thèse : Dr Jacques Mallet

Co-directeur de thèse: Dr Philippe Ravassard

Pr. Maurice Wegnez	Président
Dr. Silvia Cereghini	Rapporteur
Dr. Gérard Gradwohl	Rapporteur
Pr. Martin Catala	Examineur
Dr. Philippe Ravassard	Invité
Dr Jacques Mallet	Directeur de thèse

Remerciements

La rédaction du manuscrit de thèse représente souvent la partie la plus personnelle d'un travail collectif. Je tiens donc à remercier tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont aidé pendant mon travail de thèse. Certains par leurs conseils et leurs connaissances scientifiques, d'autres par leur soutien et leur présence.

Mes premiers remerciements vont à Jacques Mallet et ce à plusieurs titres. Tout d'abord en tant que directeur de thèse pour m'avoir accueilli en thèse. Ensuite pour m'avoir permis de travailler avec autant d'autonomie dans son laboratoire. Enfin pour la qualité scientifique et la rigueur de travail que nous, étudiants, acquérons au contact des chercheurs de l'Unité.

Je me tourne à présent vers toi Philippe Ravassard, et souhaite te remercier pour ta confiance, ta disponibilité, ta bonne humeur et ton soutien (jusqu'au bout!). Toutes ces qualités qui font qu'il est très agréable de travailler dans ton équipe. Philippe merci de m'avoir appris autant de choses tout au long de ces années de thèse. Je suis heureuse d'avoir fait un bout de chemin scientifique et technique avec toi et d'avoir vu ton équipe se construire petit à petit. Ta présence dans ce jury est ma façon de te témoigner mon respect et ma reconnaissance.

Je voudrais sincèrement remercier les membres du jury d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse. Mes vifs remerciements vont au Pr. Maurice Wegnez, qui malgré les nombreuses sollicitations, a accepté la présidence de ce jury.

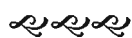
Merci au Docteur Silvia Cereghini d'avoir pris à cœur sa fonction de rapporteur et d'avoir pris le temps de me donner de précieux conseils pour finaliser mon manuscrit. J'espère en avoir tenu compte au maximum.

Merci au Docteur Gérard Gradwohl de venir de Strasbourg pour m'écouter raconter l'histoire de neurogénine 3 qu'il connaît si bien. "De par votre thématique de recherche vous étiez le rapporteur incontournable!".

Merci au Pr. Martin Catala, qui en dépit de sa lourde charge d'enseignement a gentiment accepté d'être examinateur.

Je tiens tout particulièrement à vous remercier d'avoir trouvé une date qui me permette de soutenir en cette fin d'année 2006.

Enfin je remercie sincèrement les organismes qui m'ont permis d'achever ce projet par leur soutien financier: Le ministère de l'éducation national, la FRM, l'ARC et tout particulièrement l'AFM qui a mis à ma disposition son amphithéâtre pour la soutenance.



Merci aux anciens du laboratoire d'immuno comparée où Saddredine (tu vois j'ai eu confiance!), Fabienne, Genevière (à qui je dois tous mes réflexes de biologie moléculaire), Viviane, Solange et Charles qui ont guidés faire mes premiers pas au pays des axolotls. Sans oublier l'incontournable Zandrine du labo d'au dessus et les mémorables (mais pas moins sérieux!) séminaires étudiants de l'unité 7622.

Une mention très spéciale et un énorme Merci à toi Seb pour ton soutien, heureusement que tu es là sinon qui maintenant pourrait encore expliquer la légende du "jeudi c'est vacherie..."

Jacques Charlemagne, vous qui avez toujours été disponible pour moi en temps que professeur puis en temps que directeur de DEA, c'est avec un immense respect que je dédie ce manuscrit à votre mémoire.

Merci à tous ceux que j'ai rencontré au **lgn** pour leur gentillesse et l'agréable ambiance qu'ils distillent dans le laboratoire. Ils se reconnaîtront entre-autre par leurs noms de code: Pingouin Vert, Matou Jaune, Cochon Rose, Mouton Frisé, Requin Gris, Dalida (alias motivée), Bambi Rouge, Hibou Blanc, Jack, Blaireau Noir, L'Elisa, NFM, Pôlette, Sam, Herbert ...

Un clin d'œil particulier et un grand merci à Sylvie, Julie, M-jojo, Jeannette et Olla.

Merci aux "presque nouveaux" de Mecker dont certains me sont connus depuis bien longtemps: tout d'abord l'ancêtre Latif qui me tient en respect au nom de notre passé commun..., et Annie, Isabelle, Sophie et Manu pour leur gentillesse et leur indéniable coups de mains. Un merci particulier pour les conseils d'Ali un grand frère éloigné maintenant & d'une grande sœur Samia.

Les noms de code ne sont pas encore d'usage pour les nouveaux (ou presque puisqu'il existe déjà Tali/Mymy et Vir).

La tradition du jeudi commence à s'instaurer...ainsi que les concours de petits LU

❖ Avec Tali, Vir (premiers noms de code!)

❖ les camarades de la rive gauche Aurore, Gaëlle, Albane, Volodimir, Marie-Thérèse....

❖ Ceux de la rive droite Séverine, Cécile, Ghislaine...

❖ Les camarades d'à côté (Gsa, Samira, Karima...) et d'en face (Fred, Sylvie...)

Une mention spéciale pour l'humour de Gaëlle (reste comme tu es !) et la grande brUNETTE qui cotoie les blondes...

Enfin, ces dernières lignes s'adressent directement à mes deux petites familles celle du cœur et celle d'adoption (clan Guerci et Bessades) pour leur soutien inconditionnel et sans faille. Je leur dois et je leur dédie ce manuscrit, qui aujourd'hui est autant le leur que le mien.

Là, encore une mention spéciale est à attribuer particulièrement à l'Olivier qui est encore et toujours à mes côtés.

SOMMAIRE

SOMMAIRE I

AVERTISSEMENTS V

TABLE DES ILLUSTRATIONS VI

LISTE DES TABLEAUX VIII

AVANT PROPOS IX

INTRODUCTION 1

1 Caractéristiques générales des facteurs de transcription à domaine HLH 1

1.1 Les motifs conservés 1

1.2 Classification des protéines HLH 2

1.3 Diversité des protéines HLH 5

1.4 Orthologues et organisation phylogénétique 6

1.4.1 Orthologues ou paralogues ? Tous homologues! 6

1.4.2 Classification phylogénétique des protéines HLH 7

2 RELAX : un nouveau bHLH, une nouvelle famille 8

2.1 Un peu d'histoire : le clonage de Relax 8

2.2 La structure génomique de Relax/Ngn3 9

2.2.1 Le transcrit Relax 9

2.2.2 Isolement du gène Relax 10

2.2.3 Région promotrice et identification du site d'initiation de la transcription 10

2.2.4 Localisation chromosomique 11

2.3 Les propriétés de RELAX 12

2.3.1 Le domaine basique de RELAX/ liaison à une boîte E 12

2.3.2 Modulation de l'activité transcriptionnelle par RELAX 13

2.3.3 Localisation nucléaire 14

2.3.4 Existe-t-il d'autres domaines protéiques d'intérêts? 14

2.4 Patron d'expression de Relax/Ngn3 16

2.4.1 Système Nerveux Central 17

2.4.2 Épithéliums pancréatique et digestif 20

2.4.3 Épithélium séminifère 21

2.4.4 Distribution protéique de neurogénine 3 22

2.5 Appartenance à une famille de protéines : les neurogénines 24

2.5.1 RELAX, neurogénines & co. 24

2.5.2 Neurogénines, ARP ou famille indépendante 24

2.5.3 Un motif spécifique, une signature discriminante des neurogénines 25

3 bHLH et neurogenèse 27

3.1 Spécification et détermination neurale chez D. melanogaster 28

3.1.1 Singularité du développement du tissu neural chez la drosophile 28

3.1.2 Définition des gènes proneuraux 29

3.1.3 Définition des gènes neurogéniques 35

3.1.4 Inhibition latérale 36

3.1.5 Bilan 38

3.2 Neurogenèse chez les Vertébrés 41

3.2.1 bHLH de vertébrés et fonction proneurale 43

3.2.2	Voie de signalisation Notch	52
3.2.3	Activité proneurale et Cycle cellulaire	59
3.2.4	Gènes proneuraux et spécification de sous types neuronaux chez les vertébrés.	62
3.2.5	Gènes proneuraux et spécification gliale chez les vertébrés	65
3.2.6	Conservation de la fonction proneurale entre la drosophile et les vertébrés : conclusion	70
4	Développement du système digestif	72
4.1	Organisation du tube digestif primitif	72
4.1.1	Organogenèse de l'épithélium pancréatique	75
4.1.2	Organogenèse intestinale	81
4.2	Cascade moléculaire et lignage cellulaire endocrine, rôle central de NGN3	83
RESULTAT 1 - IDENTIFICATION DES REGIONS REGULATRICES PERMETTANT L'EXPRESSION TISSULAIRE RESTREINTE DE NEUROGENINE 3		88
CONTEXTE DU PROJET : ANALYSE DES REGIONS REGULATRICES DE NGN3		88
MATERIEL ET METHODES		89
1	Régions génomiques et étude <i>in silico</i>	89
2	Cassettes de transgénèse	90
2.1	Délétions du fragment de 3,85kb	90
2.2	Clonage des fragments génomiques dans le vecteur de Transgénèse BGZ40	90
3	Transgénèse	90
3.1	Quelques définitions	91
3.2	Purification des cassettes transgéniques	92
3.3	Obtention des œufs fécondés	92
3.4	Taux de survie des œufs injectés	93
4	Etudes des embryons transgéniques	94
4.1	Collecte des embryons transgéniques	94
4.2	Vérification de l'intégration des transgènes par PCR	94
4.3	Détection de l'expression du transgène rapporteur par coloration X-gal <i>in toto</i>	95
4.4	Hybridation <i>in situ</i> et immuno-histochimie	95
ANALYSE DE LA CAPACITE D'EXPRESSION TISSU-SPECIFIQUE APPORTÉE PAR LES FRAGMENTS GENOMIQUES NGN3		97
1	Analyse <i>in silico</i> des régions promotrices du gène <i>Ngn3</i>	97
1.1	Particularités des clones 9F6 et 3E12: séquences promotrices strictes ou non?	97
1.1.1	Le clone 9F6	97
1.1.2	Le clone 3E12	97
1.1.3	Synténie et conservation inter-espèces	98
2	Obtention des constructions pour la transgénèse	99
3	Etude du fragment A par transgénèse : résume-t-il l'expression du transgène rapporteur dans les territoires endogènes de <i>Ngn3</i> ?	100
3.1	Variabilité du niveau d'expression du gène rapporteur <i>LacZ</i>	100
3.2	Analyse du patron d'expression de la cassette de transgénèse A	101
3.2.1	Dans le système nerveux central : mimétisme et ectopisme	101
3.2.2	Patrons endocrines : une forte pénétrance dans les territoires pancréatiques et intestinaux.	102
4	Analyse des fragments de délétion de la région régulatrice de <i>Ngn3</i> : les fragments B et C	104
4.1	Recherche des éléments des fragments B et C permettant l'expression tissulaire restreinte	104
4.1.1	Expression de la cassette B dans le pancréas et l'intestin (E14.5)	104
4.1.2	Co-localisation de l'expression des ARNm <i>LacZ</i> et <i>Ngn3</i>	105

4.1.3	Expression du transgène B dans le système nerveux central à E11.5	105
4.1.4	Analyse de la cassette C par transgenèse	107
4.1.5	Les autres cassettes de transgenèse (constructions de la série D)	107
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		108
1	Pertinence du fragment 3E12 testé, conservation et expression tissu-spécifique	108
2	Stratégie d'étude : <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> ?	110
3	Transgenèse : stratégie, avantages et limites	111
3.1	Choix du vecteur de transgenèse	111
3.2	Avantages : embryons jetables ou lignées établies?	112
3.3	Limites de la transgenèse additive	112
4	Bilan de l'étude des différentes constructions de transgenèse	113
4.1	Patron d'expression du transgène 3E12 (fragment A)	113
4.2	Recherche des éléments responsables de l'expression "tissu-spécifique" de <i>Ngn3</i>	114
5	Existe-il une conservation des régions régulatrices des trois neurogénines?	115
6	Perspectives	117
RESULTAT 2 - CAPACITE DE CIBLAGE DES PROGENITEURS ENDOCRINES DU PANCREAS		120
OBJECTIF, CONTRAINTES ET STRATEGIE		120
1	Les modèles expérimentaux	120
1.1	Modèle <i>ex vivo</i> par xénogreffe	120
1.2	Modèle <i>in vitro</i> de culture organotypique en matrice de collagène	122
1.3	Récapitulatif des caractéristiques principales du matériel biologique utilisé en vue de sélectionner le meilleur vecteur de transfert de gène.	123
2	Sélection du mode de transfert de gène	123
2.1	Choix des vecteurs lentiviraux	124
2.2	Obtention de vecteurs viraux spécifiques	126
2.3	Comment évaluer la spécificité et l'efficacité des vecteurs lentiviraux?	127
3	Mise en place des conditions expérimentales optimales permettant le transfert de gène dans des explants de pancréas embryonnaire	129
3.1	Bilan : influence des différents traitements sur le développement du greffon	129
3.2	Bilan : efficacité d'infection/transduction	130
4	Capacité d'infection de cellules progéniteurs/souches	130
ARTICLE DIABETOLOGIA (2005) 48 : PAGES 709–719		I
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		135
4.1	Perspective de translation de cette application à du tissu embryonnaire humain	139
4.2	Obtention de lignées stables de cellules β	141
4.3	Lignage cellulaire	142
4.4	Restauration de la fonction NGN3	143
4.4.1	Culture organotypique de tissus de souris	143
4.4.2	1 ^{ère} génération de vecteurs NGN3	144
4.4.3	Stratégie et 2 ^{ème} génération de vecteurs NGN3	144
4.4.4	Modèles de surexpression	145
RESULTAT 3 - ETUDE DE LA FONCTION NEURALE DE NGN3		147
HYPOTHESE DE TRAVAIL : NGN3 UN GENE PRONEURAL		147
MATERIEL ET METHODES		149

1	Obtention des lignées de mutants nuls	149
2	Obtention des embryons	149
3	Génotypages	150
4	HIS	150
5	Injection de Dye-I	151
6	Electroporation <i>in ovo</i> (dans le tube neural chez le poulet)	151
NOUVELLE APPROCHE POUR APPREHENDER LA FONCTION DE NGN3 : UN, PUIS DEUX, PUIS TROIS		
MODELES DE PERTE DE FONCTION		153
1	Construction du vecteur de ciblage; recombinaison homologue et production des lignées <i>Ngn3</i> ^{-/-}	153
2	Phénotype des embryons et des nouveaux nés <i>Ngn3</i> ^{-/-}	154
2.1	Effet de la mutation sur la taille et le <i>sexe ratio</i>	154
2.2	Effet de la mutation et développement du pancréas	155
3	<i>Ngn3</i> et tube neural postérieur	156
4	L'invalidation de <i>Ngn3</i> modifie-t-elle cette cartographie?	157
5	Expression ectopique d'un autre facteur proneural induit par l'absence de NGN3	159
6	Compensation fonctionnelle	160
7	Analyse du double mutant <i>Ngn3/Mash1</i>	161
7.1	Sélection de la lignée double mutante	161
7.2	Que ce passe-t-il dans le territoire le plus ventral de <i>Ngn3</i> en absence d'expression ectopique de <i>Mash1</i> ?	162
8	Phénotype terminal des cellules exprimant NGN3	163
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		164
REFERENCES		166

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Structure cristallographique de la région bHLH du dimère Max et représentation schématique des bHLH	1
Figure 2 Dendrogramme de la superfamille bHLH (d'après Massari et Murre, 2000).....	3
Figure 3 Vue taxonomique actuelle des bHLH	5
Figure 4 Sélection des oligonucléotides dégénérés pour le clonage de <i>Relax</i>	8
Figure 5 Cartographie du locus <i>Ngn3</i> contenu sur le chromosome 10 murin	10
Figure 6 Localisation chromosomique des gènes <i>NEUROG3</i> , <i>Ngn3</i> et <i>Relax</i> dans un même groupe synthénique.....	12
Figure 7 Patron d'expression de <i>Ngn3/Relax/NEUROG3/zNgn3</i> dans le Système Nerveux Central ...	17
Figure 8 Localisation restreinte des cellules exprimant <i>Ngn3</i> dans la zone de prolifération des progéniteurs neuronaux du Tube neural ostérieur	18
Figure 9 Fenêtre d'expression de <i>Ngn3</i> dans les épithéliums pancréatique et digestif	20
Figure 10 Patron d'expression de <i>Ngn3</i> dans l'épithélium séminifère.....	22
Figure 11 Alignement des séquences des premiers membres de la famille des neurogénines.....	24
Figure 12 Représentation des bHLH neuronaux (<i>Bertrand et al. 2002</i>)	42
Figure 13 Cascade d'expression des facteurs de transcription au cours du développement du pancréas d'après (Soria, 2001; Collombat <i>et al.</i> , 2003; Heller <i>et al.</i> , 2005; Jensen <i>et al.</i> , 2005; Collombat <i>et al.</i> , 2006).....	83
Figure 14 Lignage des cellules intestinales et gastriques	85
Figure 15 Synopsis des fragments génomiques obtenus par PCR et présentation de la cassette de transgénèse	90
Figure 16 Schéma synopsis d'une expérience de transgénèse classique	91
Figure 17 Différence entre embryons transgéniques et fondateurs : une question d'expression du transgène.....	91
Figure 18 Cartographie des fragments génomiques de <i>Ngn3</i> isolés.....	97
Figure 19 Constructions de transgénèse générées et homologies inter-espèces.....	100
Figure 20 Variation du niveau d'expression du transgène entre lignées 1536 et 1540.....	101
Figure 21 Patron d'expression neural de la construction de transgénèse A.....	102
Figure 22 Patron d'expression pancréatique précoce de la cassette de transgénèse A	102
Figure 23 Patron d'expression du transgène A, dans les épithélia pancréatique et duodéal des embryons	103
Figure 24 Analyse comparée sur coupes adjacentes de l'expression de <i>Ngn3</i> et <i>LacZ</i> dans le pancréas et l'intestin.....	104
Figure 25 : Co-localisation des ARNm <i>Ngn3</i> et <i>Lac-Z</i> au niveau pancréatique	105
Figure 26 Patron d'expression neuronal de la construction de transgénèse B (A1.7).	106
Figure 27 Vue générale des études "promotorologiques" de <i>Ngn3</i>	109
Figure 28 Etude préliminaire de recherche des séquences consensus de fixation d'éléments Trans putatifs.....	119
Figure 29 Vecteurs lentiviraux "ubiquitaire" (CMV) et "spécifique des cellules β" (Rip405).	127
Figure 30 Transfert de gène sur modèles de développement pancréatique in vitro & in vivo	130
Figure 31 Transduction d'ébauche pancréatique humaines 8SG : tests préliminaires.....	141
Figure 32 Comparaison des cinétiques d'expression en ARNm <i>Ngn3</i> /insuline et des différents promoteurs candidats.....	145
Figure 33 Résumé de l'hypothèse de travail: neurogénine 3 un facteur proneural.....	148
Figure 34 Principe de l'électroporation chez l'embryon de poulet	151

Figure 35 Représentation schématique du locus de neurogénine3	153
Figure 36 Cartographie et régionalisation dorso-ventrale d'expression des facteurs de transcription dans le tube neural postérieur.....	156
Figure 37 Domaine d'expression ventral de <i>Ngn3</i> est compris dans les territoires <i>Nkx2.2</i> et <i>Sim1</i>	157
Figure 38 Caractérisation des domaines <i>Nkx2.2</i> , <i>sim1</i> et <i>delta1(dll1)</i> chez le mutant <i>Ngn3</i>	158
Figure 39 <i>Mash1</i> : un candidat exprimé dans le territoire <i>Ngn3</i> chez le mutant nul <i>ng3^{-/-}</i>	159
Figure 40 Modification des patrons d'expression <i>Islet 1et2</i> chez le mutant <i>Ngn3</i>	160
Figure 41 Comparaison des profils d'expression des marqueurs <i>Nkx2.2</i> , <i>Dll1</i> , <i>Jagged</i> , <i>Hes5</i> et <i>Sim1</i> chez les simples et doubles mutants <i>Mash1^{-/-}</i> ; <i>Ngn3^{-/-}</i>	162
Figure 42 Patrons d'expression <i>Vglut2</i> et <i>3</i> dans le territoire <i>ngn3⁺</i> le plus ventral de la moelle épinière	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Caractéristiques des sept classes de bHLH classique et des coe-HLH3

Tableau 2 Recensement des protéines fonctionnelles ou putatives présentant un motif HLH conservé. 5

Tableau 3 Description des propriétés de Relax..... 12

Tableau 4 Corrélation entre les stades embryonnaires chez le rat et la souris (post-fécondation). 16

Tableau 5 Récapitulation des anticorps dirigés contre neurogénine 3.....22

Tableau 6 Stratégies d'isolement de bHLH proneuraux41

Tableau 7 Correspondance entre facteurs proneuraux drosophiliens et vertébrés.....43

Tableau 8 Correspondance entre facteurs neurogéniques drosophiliens et vertébrés.....53

Tableau 9 Odonancement d'apparition des différentes hormones pancréatiques 79

Tableau 10 Références et sites bioinformatiques utilisés pour les analyses de séquences *in silico*89

Tableau 11 Profil de conservation inter-espèces des fragments génomiques de *Ngn3*.....99

Tableau 12 Caractéristiques principales des tissus embryonnaires utilisés dans les modèles xénogreffes et organotypiques..... 123

Tableau 13 Récapitulation des expériences d'infection d'ébauches pancréatiques de rat 129

Tableau 14 Récapitulatif des amorces utilisées lors des PCR de géotypage des animaux et embryons Ngn3; Mash1 et double-mutants..... 150

AVANT PROPOS

Le laboratoire de Jacques Mallet s'intéresse depuis de nombreuses années à la compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques des maladies neurodégénératives. Lorsque je suis arrivée au LGN, une nouvelle thématique de recherche mise en place par Philippe Ravassard s'est créée à la suite de l'isolement et de la caractérisation chez le rat, de Relax un nouveau facteur de transcription de la famille basique Hélice-Boucle-Hélice (bHLH). Le patron d'expression spatio-temporel de Relax et les premières études de surexpression indiquaient que ce facteur pourrait être impliqué dans la détermination de la différenciation neuronale au cours du développement embryonnaire.

Son homologue Ngn3 (neurogénine 3) a été caractérisé au même moment chez la souris. Ngn3/Relax sont exprimés de façon restreinte et transitoirement dans des progéniteurs localisés dans certains territoires du système nerveux central (SNC) : les régions ventrales hypothalamiques, le tube neural postérieur médullaire (bandes ventrale et médiane), les épithéliums pancréatique, gastro-intestinal et séminifère.

C'est au sein de l'équipe "développement neuronal" que mon travail de thèse a été réalisé. Nous avons cherché à comprendre d'une part les mécanismes impliqués dans la mise en place et le contrôle de l'expression tissulaire restreinte du gène neurogénine 3 au cours du développement embryonnaire dans les épithéliums neuronal et pancréatique. D'autre part, nous avons cherché à démontrer la fonction de NGN3 dans son territoire d'expression le plus ventral du tube neural médullaire (bande v).

Pour aborder ces questions j'ai mis au point et validé les outils moléculaires et les modèles développementaux permissifs, pour l'analyse de la régulation et de la fonction du gène Ngn3.

Avant d'exposer les résultats obtenus et de discuter de la dualité de fonction de NGN3 dans les étapes clés de la détermination des progéniteurs neuronaux et endocrines, il m'a paru indispensable de resituer: (i) le facteur de transcription neurogénine 3 en tant que membre de la vaste superfamille de bHLH; (ii) les étapes développementales dans lesquelles ce facteur de transcription est impliqué.

L'exposé des résultats obtenus au cours de mon stage doctoral se présente en trois parties:

[1] Au cours de la première partie, est développée la recherche des séquences nécessaires et suffisantes permettant de résumer l'expression tissulaire restreinte de Ngn3 au cours du développement des systèmes nerveux et endocrine. Pour ce faire nous avons opté pour une approche par transgénèse additive sur embryons fondateurs et lignées établies.

[2] Nous avons dans un second axe, mis au point un système efficace de transfert de gène afin de tracer les cellules progénitrices/souches du pancréas embryonnaire endocrine murin et humain. Pour cette approche, le transfert de gène par vecteur lentiviral s'est avéré très efficace et très stable.

[3] La fonction proendocrine de NGN3 est maintenant très bien renseignée, en comparaison de ce que l'on sait de sa fonction précise dans le SNC. Nous avons donc entrepris de déterminer sa fonction au cours de la neurogenèse.

Enfin, les conclusions de chacun des trois chapitres de résultats présentent les connexions existantes entre les trois axes de mon projet qui vont permettre de progresser dans la compréhension des mécanismes qui régulent l'une des molécules clés de la détermination du lignage pancréatique et de celui de sous-population neuronale.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1 Caractéristiques générales des facteurs de transcription à domaine HLH

Les protéines à motif hélice-boucle-hélice, ou HLH pour "helix-loop-helix", forment une superfamille de régulateurs transcriptionnels très représentés dans l'ensemble du taxon eucaryote.

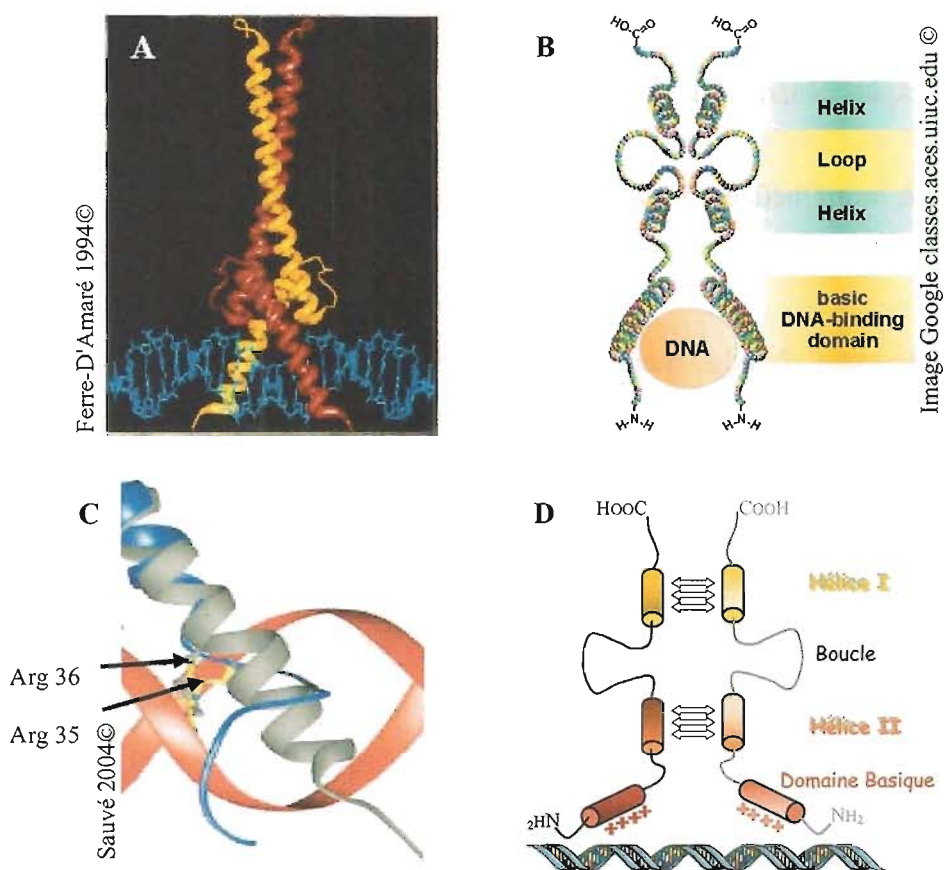
Un nombre important d'études menées chez la drosophile, le xénope, les mammifères a largement démontré le rôle crucial des HLH dans la régulation de nombreux processus développementaux aussi variés que la myogenèse, la lymphopoïèse et la neurogenèse (Lee, 1997; Arnold et Winter, 1998; Guillemot, 2000; Bertrand *et al.*, 2002; Brand-Saberi, 2005; Kageyama *et al.*, 2005; Murre, 2005). Ces protéines interviennent aussi dans des pathologies humaines impliquant des dérégulations de la prolifération et de la différenciation cellulaires (Norton, 2000; Hasskarl et Munger, 2002).

1.1 Les motifs conservés

Le motif commun à toutes les protéines de la superfamille Hélice-Boucle-Hélice (HLH) comporte 40 à 50 acides aminés et se compose de deux hélices α amphipathiques très conservées, désignées I et II, séparées par une boucle flexible non conservée et de taille variable (Ferre-D'Amare *et al.*, 1993; Ellenberger *et al.*, 1994; Garvie et Wolberger, 2001). Les hélices I et II sont composées de 12 à 15 acides aminés chacune et portent des résidus hydrophobes orientés le long de l'axe de l'hélice nécessaires à la fonction de dimérisation inter-HLH.

La **Figure 1(B, D)** illustre la représentation schématique "classique" des bHLH.

La fixation à l'ADN de ces facteurs de transcription est assurée directement par une région basique fortement conservée, directement adjacente au côté N-terminal du domaine HLH et stabilisée par la formation de dimères au niveau du domaine HLH. L'hélice II participe aussi directement à la reconnaissance spécifique du motif d'ADN cible, puisque sa substitution par un autre motif hélice II abolit la capacité de reconnaissance de la protéine MYOD pour son site de prédilection (Voronova et Baltimore, 1990).



Le rôle de chacun de ces domaines dans la dimérisation et/ou la fixation à l'ADN a été évalué par mutagenèse (délétions, substitutions de domaines ou d'acides aminés) ce qui a permis de mettre en évidence la relation entre ces domaines protéiques et leur importance fonctionnelle (Voronova et Baltimore, 1990; Davis et Halazonetis, 1993; Kophengnavong *et al.*, 2000).

La structure tridimensionnelle du motif basique HLH (bHLH) a été déterminée. Les polypeptides bHLH correspondant aux deux protéines MAX et E47 ont été cristallisés en présence d'un fragment d'ADN contenant la séquence hexa-nucléotidique cible pour la liaison de ces protéines. La structure de ces protéines liées à leur motif cible a été déterminée avec une résolution de 3,3 Å et 2,8 Å, respectivement (Ellenberger *et al.*, 1994; Ferre-D'Amare *et al.*, 1994). Les structures tridimensionnelles du complexe dimère Max/ADN à l'état libre ou activé sont représentées sur les planches **A et C** de la **Figure 1** (Ferre-D'Amare *et al.*, 1993; Ellenberger *et al.*, 1994; Ferre-D'Amare *et al.*, 1994; Garvie et Wolberger, 2001; Marmorstein et Fitzgerald, 2003; Sauve *et al.*, 2004).

Ces analyses ont permis de dégager deux caractéristiques générales des facteurs bHLH :

- (i) La région basique forme une hélice α dans le prolongement de l'hélice I ;
- (ii) La formation d'un dimère par association des régions HLH permet aux deux domaines basiques ainsi rapprochés de contacter la séquence hexa-nucléotidique cible dans le grand sillon de l'ADN, chaque domaine basique contactant une moitié de la séquence de fixation.

1.2 Classification des protéines HLH

Les premières classifications des protéines HLH sont fondées sur les similitudes des séquences protéiques à l'intérieur du domaine HLH, en intégrant trois critères supplémentaires :

- (i) la distribution des domaines d'expression,
- (ii) la liaison à des motifs nucléotidiques spécifiquement reconnus (éléments cis consensus),
- (iii) leurs propriétés de dimérisation (Murre *et al.*, 1989; Murre *et al.*, 1994).

Ce mode de classification est toujours d'actualité et permet de regrouper les principaux facteurs HLH en sept familles distinctes notées classes I à VII (Massari et Murre, 2000). Le dendrogramme représenté **Figure 2**, a été généré à partir du programme ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

Les protéines bHLH de type A ou classe II, qui nous intéressent tout particulièrement ont été très largement étudiées. Cette famille se compose par exemple de nombreux facteurs impliqués dans les processus développementaux tels que Achaete (protéine T5 du complexe Achaete-Scute) , la protéine Scute (protéine T4 du complexe Achaete-Scute), la protéine atonal, la protéine Achaete-scute homolog 1 ou MASH1 ou encore les neurogénines (NEUROGs). Les membres de cette famille présentent des profils d'expression très restreints aux niveaux spatial et temporel. Ils sont impliqués dans le contrôle de l'expression tissulaire restreinte d'un très grand nombre de gènes, notamment au cours de la neurogenèse (Davis *et al.*, 1990; Guillemot, 2000; Bertrand *et al.*, 2002; Hatakeyama et Kageyama, 2004).

Ces facteurs de transcription s'associent préférentiellement en hétéro-dimères avec des protéines de la classe I (bHLH de type E), comme par exemple la protéine daughterless ou E12/47, qui sont généralement décrites comme ubiquitaires. Elles sont capables de former à la fois des homo- et des hétéro-dimères (Murre *et al.*, 1989).

Le **Tableau 1** présente les caractéristiques des 7 familles HLH auxquelles nous avons rattaché la famille des coe-HLH. En fonction des particularités de chacune (domaines supplémentaires ou absents), certaines semblent prédisposées à la régulation des autres.

- ❖ Classe III et IV : les bHLH-Zip à "glissière à leucines" (c-MYC/SREBPs et MAX/MAD).

Les membres de cette famille forment un réseau de facteurs activateurs-répresseurs impliqués dans les mécanismes de différenciation/prolifération/apoptose. Le domaine additionnel /(Zip) permet une dimérisation supplémentaire (Baudino et Cleveland, 2001; Luscher, 2001). Ils fonctionnent essentiellement sous forme d'hétérodimères en association avec des bHLH de classe IV (MAX/MAD) ou en tandem avec des éléments de classe III (MAX/MYC).

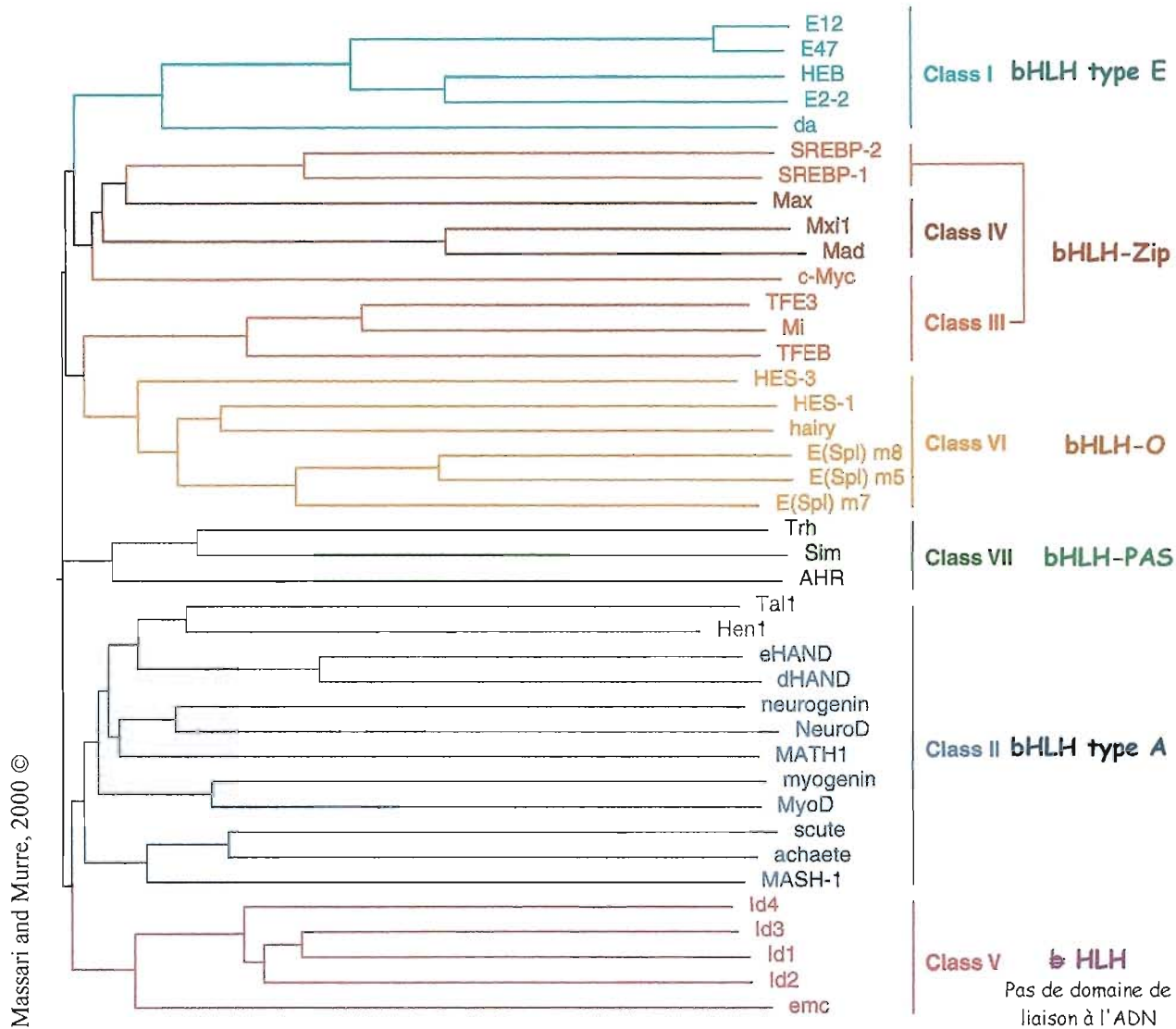
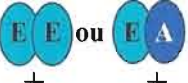
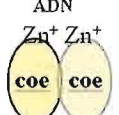


Figure 2 Dendrogramme de la superfamille bHLH

Alignements multiples et classification des membres représentatifs de chaque famille HLH. (Massari et Murre, 2000).
 Le dendrogramme présenté ici a été construit par alignement multiple des séquences protéiques des domaines HLH à l'aide du programme Clustal W[†] (Saitou et Nei, 1987; Thompson et al., 1994). Il permet, tout en tenant compte des similitudes de séquences protéiques, de relier les 40 membres représentatifs des sous-familles de bHLH et de les regrouper en 7 classes (classes I à VII). Les caractéristiques de chacune de ces classes se trouvent résumées dans le tableau1.

[†] Clustal W [algorithme heuristique] permet: (i) d'aligner globalement des séquences deux à deux et d'en déduire une matrice de distance, reflet de la divergence entre chaque paire de séquences, (ii) de créer un arbre guide non raciné, dont la distance des branches est proportionnelle aux scores de la matrice de distance [algorithme Neighbor Joining – Saitou N, Nei M (1987), (iii) d'aligner de proche en proche les séquences en fonction de l'ordre pré-établi par l'arbre guide.

Classe *	Domaine Basique	Autres domaines spécifiques	Motif ADN cible	Dimérisation	Implication dans des processus biologiques Exemples et références
Classe I Protéine E <i>Distribution ubiquitaire</i>	x		Ebox A CA ^C / _G CTG		Processus développementaux <i>Davis et al., 1990; Guillemot, 2000; Bertrand et al., 2002; Hatakeyama et Kageyama, 2004</i>
Classe II Protéine A <i>Distribution tissu spécifique</i>	x		Ebox A CA ^C / _G CTG		
Classe III Famille Myc	x	glissière à leucines	Ebox B CA ^C / _T CTG		Mécanismes de différenciation, prolifération ou apoptose <i>Baudino et Cleveland, 2001 ; Luscher, 2001</i>
Classe IV Famille Max/Mad	x	glissière à leucines	Ebox B CA ^C / _T CTG		
Classe V** Protéine Id \ R					Régulation du cycle cellulaire, de la différenciation des progéniteurs neuronaux et mammaires. <i>Desprez et al., 2003; Ruzinova et Benezra, 2003; Iavarone et Lasorella, 2004</i>
Classe VI** Famille bHLH-O	x°	Orange C-ter WRPW ↔ Grucho	Ebox C CACGCG Nbox CACNAG		Effecteur négatif de la voie notch/delta <i>Kageyama et al., 2005</i>
Classe VII Famille bHLH-PAS	x	PAS en C-ter	Ebox C TNCGTG XRE/HRE ^/ _G CGTG		Réponse stress hypoxique, régulation du cycle circadien <i>Hahn, 2002; Panda, Hogenesch et al., 2002; Bracken et al., 2003; Kewley, Whitelaw et al., 2004</i>
Coe-HLH		COE N-ter doigts de zinc	AT ₂ C ₃ N ₂ G ₃ A ₂ T ₂		Lymphopoïèse B, adipogenèse <i>Dubois et Vincent, 2001; Fraser, 2004</i>

*Classification d'après Murre 1994 ** Régulateurs directs des membres des classes I & II ° Domaine basique riche en proline (substitution R>P)

Remarque: Les propriétés de dimérisation qui sont données en exemple correspondent aux situations les plus fréquemment citées et observées et ne reflètent pas l'ensemble des possibilités.

Tableau 1 Caractéristiques des sept classes de bHLH et des coe-HLH

- ❖ Classe V / répresseur indirect (protéine inhibiteur de la fixation à l'ADN : Id 1-4 ; la protéine extra-macrochaetae : Emc)

Il s'agit de répresseurs de transcription indirects, ne possédant pas le domaine basique permettant la liaison à l'ADN. Ils inhibent l'activité des bHLH et d'autres protéines en formant des hétérodimères incapables de se lier à l'ADN. Ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires et développementaux (Desprez *et al.*, 2003; Ruzinova et Benezra, 2003; Iavarone et Lasorella, 2004).

- ❖ Classe VI : les bHLH-O (facteurs de transcription HES, la protéine hairy, les protéines enhancer of split : E(Spl))

Les protéines bHLH-O sont regroupées au sein de la même famille parce qu'elles possèdent en commun un domaine supplémentaire conservé caractéristique appelé domaine Orange (Dawson *et al.*, 1995) ou Hélice 3-4. Ce domaine est composé en moyenne d'une quarantaine d'acides aminés, et n'a jamais été identifié jusqu'à présent dans une protéine n'appartenant pas à la famille des bHLH (Davis et Turner, 2001). Les extrémités N et C terminales de ces protéines contiennent aussi des motifs conservés: un motif basique particulièrement riche en proline et une extrémité C-terminale possédant un motif conservé (WRPW/Y), dont la fonction de répression de la transcription est bien établie pour les protéines HES (Kageyama *et al.*, 2005). Ces facteurs interviennent notamment dans la cascade de régulation de la voie d'inhibition latérale pour réprimer la transcription des facteurs de transcription qui confèrent aux gènes qu'ils régulent une expression cellulaire restreinte.

- ❖ Classe VII les bHLH-PAS (AHR/Aryl hydrocarbon receptor, SIM/Protein single-minded).

Les membres de cette famille possèdent un domaine dénommé PAS (PER/Aryl hydrocarbon receptor translocator (ARNT)/Single minded) localisé en position C-terminale par rapport au motif bHLH. Ce dernier est probablement responsable de la stabilisation, du repliement et de la dimérisation de ces protéines. Les bHLH-PAS interviennent notamment dans le métabolisme des toxines, en réponse à l'hypoxie, dans le contrôle du rythme circadien et le développement embryonnaire (Hahn, 2002; Panda *et al.*, 2002; Bracken *et al.*, 2003; Kewley *et al.*, 2004).

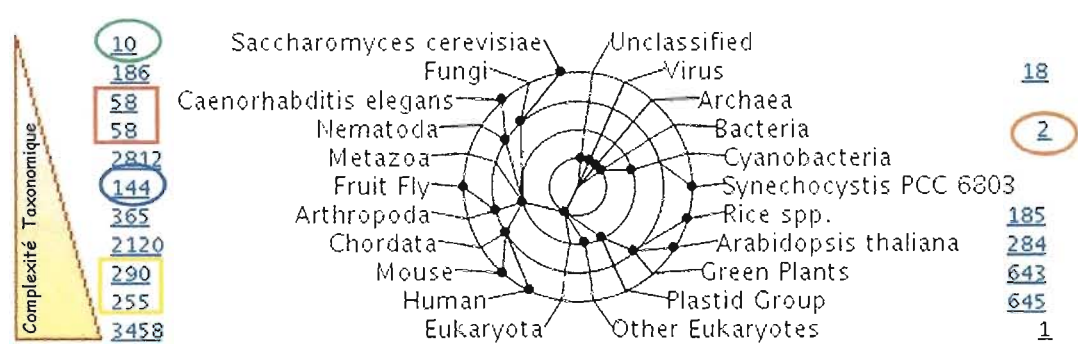


Figure 3 Vue taxonomique actuelle des bHLH

Le site de l'EMBL (European Bioinformatics Institute) réactualise cette vue d'ensemble des HLH en temps réel en fonction des informations entrées sur les bases de données InterPro. L'objectif est d'avoir une vision taxonomique didactique. La racine de cet arbre taxonomique se trouve en son centre. Les nœuds représentés ici sont de véritables taxons. Ils sont disposés sur différents cercles intérieurs. Cependant, aucune signification n'est attachée à la position du nœud sur un même cercle, bien qu'une tentative ait été faite de grouper des nœuds. Les lignes radiales sont associées directement par liens hypertextes aux descriptions de chaque protéine décrite en tant que bHLH pour chacun des taxons annoncés.

Lien EMBL : <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR001092>

	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophile</i>	<i>Souris</i>	<i>homme</i>	références
Recensement de HLH	39	58	102	125	Ledent et al 2002
Recensement mis à jour	58	144	290	255	EMBL 2006

Tableau 2 Recensement des protéines fonctionnelles ou putatives présentant un motif HLH conservé.

- Et peut être une Classe VIII? Les Coe-HLH (facteur de transcription collier ; Olf1/Olfactory receptor 1 ; EBF/ Early B-cell factor).

Ces facteurs constituent une famille qui n'apparaît pas dans la classification de Massari et Murre (Massari et Murre, 2000) du fait de leur fixation à l'ADN atypique par rapport aux autres HLH. En effet, à la place du domaine basique quasi-universel (à l'exception des protéines de la classe V), les Coe-HLH présentent un domaine à doigts de zinc localisé dans la région N-terminale. De plus la dimérisation de ces facteurs s'effectue par la présence de trois hélices (Dubois et Vincent, 2001).

1.3 Diversité des protéines HLH

Grâce aux projets concertés de séquençages de génomes (The C.elegans Sequencing Consortium, 1998; Venter *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2000; Lander *et al.*, 2001), et aux outils bioinformatiques (banques génomiques et protéiques réactualisées, algorithmes de recherche de motifs conservés et de similitudes de séquences), nous disposons de quantités d'informations nouvelles permettant de compléter régulièrement la classification des protéines HLH.

Par exemple, Ledent *et al.* (2002) ont recensé le nombre total de protéines HLH chez *C. elegans*, la drosophile, la souris et l'homme. Un même recensement effectué aujourd'hui par l'institut européen de bioinformatique permet de prédire un nombre beaucoup plus important de facteurs HLH, comme présenté dans la vue taxonomique (**Figure 3**). Au vu des valeurs reportées dans le **Tableau 2**, le gain d'informations disponibles apparaît évident.

A l'heure actuelle, il n'existe qu'un seul exemple d'une séquence protéique bHLH chez les procaryotes décrite pour une bactérie pathogène (*Coxiella burnetii*) classée comme agent bio-terroriste de catégorie B. En dehors de cette exception, dont on ne connaît pas encore la fonction, la diversité des protéines HLH ne semble concerner que les eucaryotes. Il est intéressant de noter que le nombre de HLH croît en fonction de la complexité des organismes, suggérant un lien phylogénétique avec un gène ancestral commun qui aurait évolué tout en conservant une fonction générique initiale.

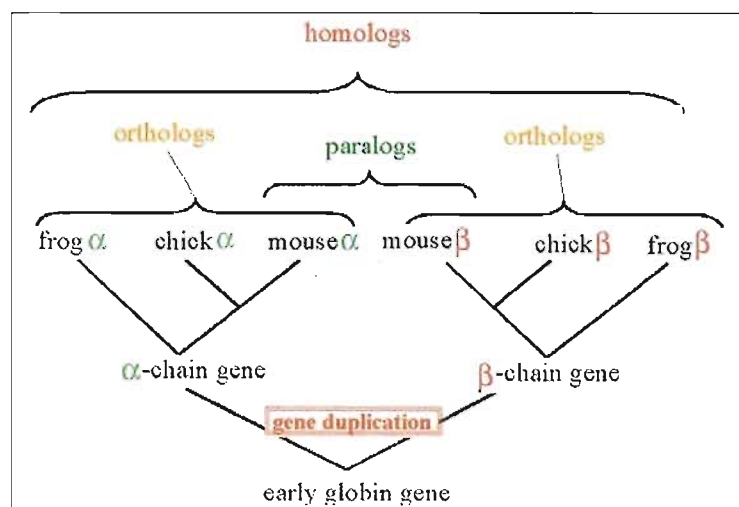
Devant le nombre croissant de protéines HLH identifiées, une autre approche de classification dite "naturelle" a permis de créer un premier arbre phylogénétique sur un grand échantillonnage (240 motifs HLH) décrivant ainsi un patron des variations de séquences inter espèces (Atchley et Fitch, 1997). Les critères de regroupement utilisés tiennent compte de la spécificité de liaison à l'ADN et du degré de conservation des acides aminés à certaines positions du domaine bHLH. De grandes familles ont été regroupées initialement en quatre groupes monophylétiques, A à D, qui comportent plus de 24 familles de protéines. Depuis, deux autres groupes intégrant les Coe-HLH, ont été classifiés en accord avec leurs liens au cours de l'évolution (Ledent et Vervoort, 2001). Les composantes inter-espèces intégrées dans cette dernière classification semblent fournir des moyens plus précis et plus commodes de catégorisation des nouveaux membres à venir.

1.4 Orthologues et organisation phylogénétique

Comme préalable à l'analyse phylogénétique de cette superfamille HLH, il est important de distinguer, au sein des groupes d'homologues, les orthologues des paralogues.

1.4.1 Orthologues ou paralogues ? Tous homologues!

Ce schéma présentant l'évolution moléculaire du gène de la globine illustre de manière simple les différences fondamentales entre les notions d'orthologues et de paralogues.



- ❖ Gènes orthologues : gènes d'espèces différentes dont les séquences sont **homologues**, et qui dérivent d'un ancêtre commun (divergence à la suite d'un évènement de spéciation). Ils n'ont pas nécessairement la même fonction.
- ❖ Gènes paralogues : gènes d'une même espèce, dont les séquences sont **homologues** et qui résultent de la duplication d'un même gène ancestral.

Ainsi, seul le classement en grandes familles d'orthologues permet de décrire avec précision les relations phylogénétiques existant entre les différents membres d'un groupe multigénique aussi complexe que celui des protéines HLH.

1.4.2 Classification phylogénétique des protéines HLH

Il n'existe pas de critères absolus capables d'établir si deux gènes sont des orthologues. Lors de la construction d'arbres phylogénétiques (le plus souvent à l'aide d'algorithmes d'analyse du plus proche voisin : "neighbor-joining"), chaque branche de l'arbre est soumise à un calcul statistique itératif (1000 fois). On appelle valeur de "bootstrap" le nombre de fois qu'une position identique d'une branche a été retrouvée sur 1000 itérations. Cette valeur permet d'évaluer la robustesse d'une prédiction avant de définir les groupes monophylétiques (Ledent et Vervoort, 2001; Ledent *et al.*, 2002). Ce type d'analyse sur de grands échantillons (plus de 350 alignements) a permis de définir 44 groupes d'orthologues, dont 36 sont exclusifs des métazoaires et deux sont communs aux levures et aux eucaryotes supérieurs.

En terme d'évolution moléculaire, la fonction des HLH chez les eucaryotes unicellulaires, tels que la levure *S. Cerevisiae*, est restreinte principalement aux voies métaboliques vitales, comme par exemple l'adsorption de phosphate et la biosynthèse des phospholipides (Robinson et Lopes, 2000). Il semble évident que les fonctions des HLH entre organismes uni et pluri cellulaires ont largement divergé. Dans les organismes multicellulaires, les facteurs de HLH sont engagés dans une multitude de processus développementaux importants et variés, incluant la neurogenèse, la myogenèse, l'hématopoïèse, pour ne citer que ces quelques fonctions abondamment illustrées dans la littérature.

L'absence de protéines HLH de classe V (Id) chez la levure et le nématode (Ruvkun et Hobert, 1998) pourrait suggérer une évolution tardive de la fonction d'inhibition de l'activité HLH par la formation d'un complexe interdisant la liaison à l'ADN.

2 RELAX : un nouveau bHLH, une nouvelle famille

2.1 Un peu d'histoire : le clonage de *Relax*

Au laboratoire, le gène *Relax* a été isolé par "RT-PCR dégénérée" à partir d'ARNm extraits de ganglion cervical supérieur de rat nouveaux nés (Ravassard *et al.*, 1997a). L'alignement multiple (**Figure 4**) de différents domaines bHLH neuronaux disponibles à l'époque (AS-C : transcrit T3 (lethal of scute), T4 (scute), T5 (achaete), T8 (asense) ; MASH1 et 2 et M-twist) a permis de choisir et de synthétiser des oligonucléotides dégénérés (représentés par les flèches rouge et bleue) afin d'amplifier par PCR les séquences comprises entre les régions basiques et l'hélice II.

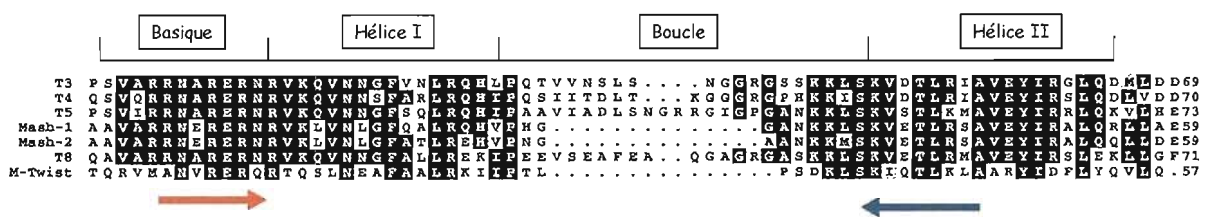


Figure 4 Sélection des oligonucléotides dégénérés pour le clonage de *Relax*

Dans le cas particulier du clonage de *Relax*, 40% des clones isolés après "RT-PCR dégénérée" possédaient une séquence homologue à l'hélice I des bHLH, et seul un clone correspondait à un nouveau bHLH. L'obtention des régions en 3' et 5' du produit de PCR initialement isolé a été réalisée par la technique de PCR ancrée mise au point dans le laboratoire (Ravassard *et al.*, 1997a; Ravassard *et al.*, 2003). L'utilisation de la PCR ancrée est une alternative au criblage d'une banque d'ADNc. Cette méthode a permis d'isoler un ADNc de 1491pb contenant une phase ouverte de lecture codant une protéine bHLH de 214 acides aminés. L'expression de ce nouveau facteur bHLH dans la moelle épinière d'embryon de rat est organisée en bandes longitudinales. Cette caractéristique a conduit à nommer cet ADNc *Relax*, pour **Rat Embryonic Longitudinal AXis** (Ravassard *et al.*, 1997a) (GenBank [Y10619](#)).

En parallèle du clonage de *Relax*, les équipes de François Guillemot (IGBMC-Strasbourg) et de David J. Anderson (California Institute of Technology-Pasadena) ont identifié chez la

souris de nouveaux gènes bHLH : les neurogénines 1 à 3 (*Ngn1*, 2 et 3), initialement appelés *Math4C*, A et B (Gradwohl *et al.*, 1996; Sommer *et al.*, 1996a; Cau *et al.*, 1997). Les premières comparaisons avec *Relax* ont révélé qu'il s'agit de gènes homologues constituant une nouvelle famille de gènes bHLH (voir § 2.5).

2.2 La structure génomique de *Relax/Ngn3*

2.2.1 Le transcrit *Relax*

Au vu des orientations de mon projet de thèse, la distribution spatio-temporelle des ARNm *Relax* fera l'objet d'un intérêt particulier et donc d'un paragraphe indépendant (§2.4).

L'ADNc *Relax* isolé à l'origine chez le rat comprend 1491pb et contient une phase ouverte de lecture de 645pb. L'environnement nucléotidique du premier ATG de la séquence codante correspond à la séquence consensus de type Kozak ($^A/GNNATG^A/G$) importante pour le démarrage de la traduction. Aucun site de polyadénylation n'a été identifié dans cet d'ADNc.

L'analyse par "Northern blot" de l'ARNm de *Relax* a révélé un transcrit unique de 3,1kb dans la moelle épinière d'embryons E12,5 de rat (Ravassard *et al.*, 1997a)

L'homologue humain de *Relax*, *NEUROG3*, a été isolé par RT-PCR à partir d'ARNm de moelle épinière d'embryon humain âgé de sept semaines (Ravassard, données personnelles enregistrées sur la GenBank AJ133776). Cet ADNc contient une phase ouverte de lecture de 645pb identique à 81% à la séquence *Relax*. Il code une protéine *NEUROG3* de 214 acides aminés, qui possède un taux de conservation de 78% avec son homologue *RELAX*.

Par soucis de clarté et bien que la nomenclature de ce gène soit maintenant homogène (*neurog3*), nous maintiendrons l'utilisation de la terminologie *Relax* pour la séquence du gène de rat, de *Ngn3* pour la souris et *NEUROG3* pour la séquence humaine. De plus les homologues des autres espèces présentés dans le paragraphe §2.4 seront annotés de la façon suivante : à savoir la première lettre indiquant l'espèce suivie du symbol du gène *Ngn3*.

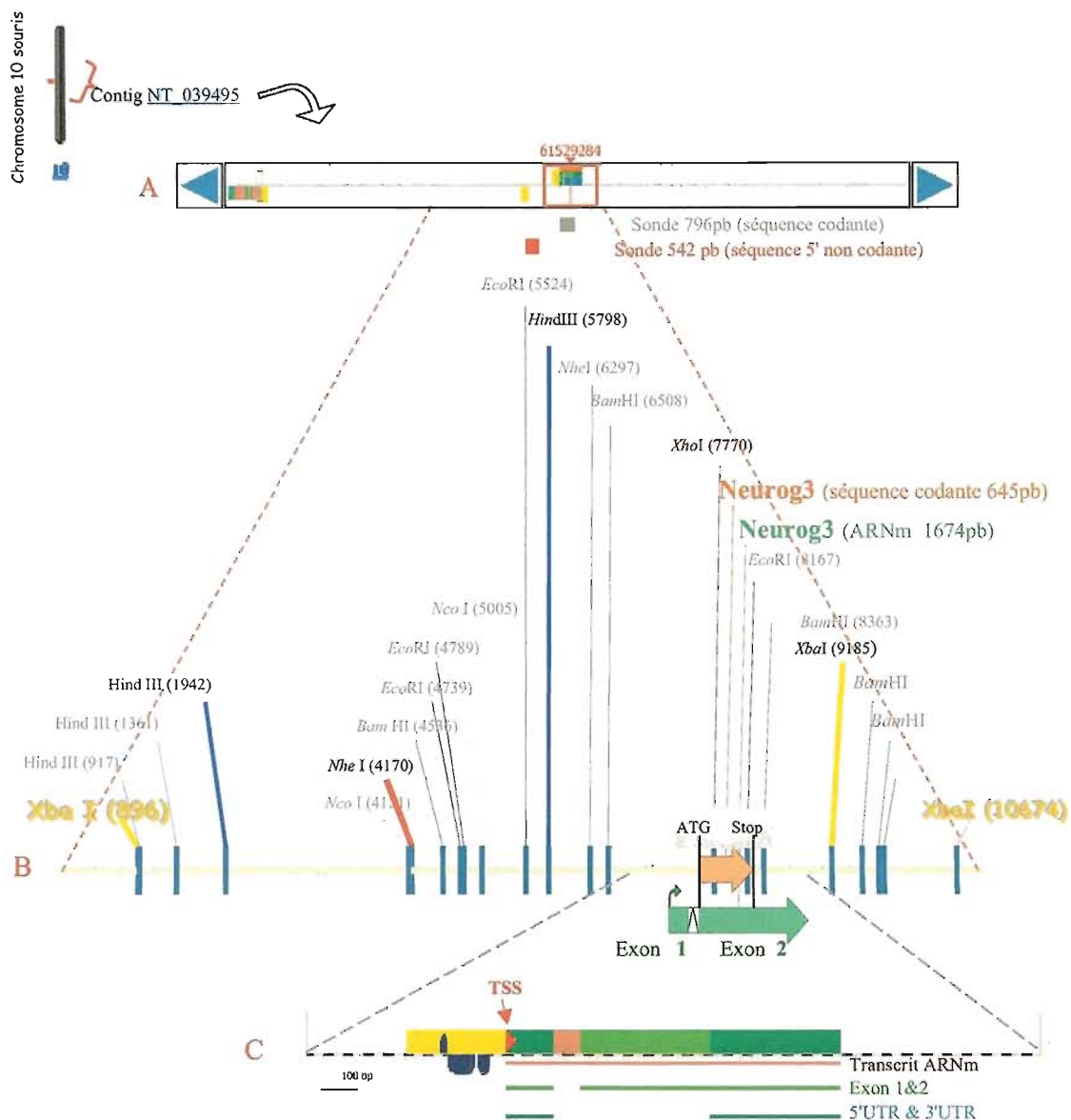


Figure 5 Cartographie du locus *ngn3* contenu sur le chromosome 10 murin

(A) Représentation schématique de l'environnement génomique [50kb] du locus *ngn3* (Génomatrix®). Les deux sondes utilisées au laboratoire pour isoler la séquence codante et les régions du promoteur distal sont représentées respectivement en **gris** pour le fragment homologue à la totalité de la séquence codante (position 389 à 1187 de la séquence EMBL#Y10619) et en **rouge** pour la région située en 5' du gène.

(B) Carte de restriction de l'ensemble des fragments génomiques isolés au laboratoire (vectorNTI®-Invitrogen). Nous avons ajouté les deux sites **XbaI** bordant l'insert dans le vecteur Lambda FIX® II. Ces deux limites correspondent au fragment génomique (9F6) de 8,3 kb; De la même façon sont matérialisées les bornes **HindIII** d'un second fragment (3E12) de 3,85kb du promoteur distal de *ngn3*.

➤ Nous verrons l'importance de ces deux fragments génomiques au cours de la première partie des résultats.

(C) Agrandissement d'une région de 4kb bordant la séquence codante de *ngn3* (Génomatrix®). L'analyse de l'organisation du gène *ngn3* a montré l'existence de **deux exons** de 238 et 1302pb, interrompus par un intron de 163 paires de bases. L'exon 2 contient la totalité de la séquence codante (ATG-Stop : 645pb. Représenté sur la figure B par **orange**). La longueur attendue du transcrit *ngn3* est de 1,67kb (**en marron**). La boîte **jaune** représente les limites du promoteur minimal prédit par Genomatix (600pb); les curseurs **bleus marines** sont des motifs/modules conservés prédits sur cette séquence (nous en reparlerons dans §5.1.4).

➤ Il est intéressant de noter que le gène humain est constitué de façon similaire à l'organisation de celui de la souris.

2.2.2 Isolement du gène *Relax*

Le criblage d'une banque génomique de souris de la lignée 129/SvJ a permis d'isoler plusieurs fragments génomiques contenant le gène *Ngn3*, (Philippe Ravassard, données personnelles, voir **Figure 5**).

Les régions régulatrices du gène *Ngn3* ont été isolées avec une sonde contenant la région 5' non codante de *Relax*. Parmi les clones positifs deux fortement intéressants nommés 9F6 et 3E12 ont été isolés et sous-clonés. La cartographie de restriction des fragments génomiques contenus dans ces deux clones a montré qu'ils présentent respectivement 9 et 3,6 kb de régions promotrices de gène *Ngn3* (communications personnelles P. Ravassard et Florence Marsais).

2.2.3 Région promotrice et identification du site d'initiation de la transcription

La région promotrice d'un gène eucaryote peut être très vaste et s'étendre sur plusieurs centaines ou plusieurs dizaines de milliers de bases. De façon schématique, elle se compose:

- (i) Des éléments ubiquitaires présents sur la plupart des séquences promotrices et utilisés de façon constitutive pour démarrer la transcription. Ces éléments font partie du promoteur proximal et du "core promoteur" (promoteur minimal). Cette région promotrice se trouve au voisinage immédiat du site de démarrage de la transcription (ou TSS pour Transcription Start Site) dont la position sur le gène est notée (+1). Il en découle une numérotation négative des nucléotides situés en amont (5') et une incrémentation positive des bases situées en aval (3') du TSS composant le transcrit. La région promotrice recrute deux types de facteurs de transcription : **(1)** les facteurs généraux de transcription, ubiquitaires, qui participent à formation du complexe de démarrage de la transcription **(2)** les facteurs de transcription, spécifiques, dont le rôle est de moduler l'efficacité de la transcription des gènes.
- (ii) Des éléments cis-régulateurs ("enhancer") contenus généralement dans la partie distale du promoteur, et parfois dans la région en 3' de la séquence codante du gène. Ces éléments cis fixent les facteurs de transcription spécifiques, appelés éléments trans-régulateurs. Ils

participent de façon spécifique à la régulation de la transcription du gène en fonction des tissus, des stades développementaux et des états pathologiques.

La position du TSS peut être déterminée *in silico*, mais il est nécessaire de la valider expérimentalement. L'ensemble des motifs conservés, fréquemment localisés dans les régions promotrices des gènes eucaryotes, sont utilisés pour modéliser un "promoteur consensus" désigné promoteur *in silico* par des méthodes de bioinformatique. Selon le niveau de stringence et la comparaison avec des séquences orthologues (validées expérimentalement), ces algorithmes permettent de prédire la présence d'une région promotrice dans une séquence analysée. Lorsque la séquence promotrice de *Ngn3* est soumise à de tels algorithmes, des éléments conservés sont détectés dans une région d'environ 600pb proche de la partie codante (500pb en 5' de l'exon 1 du gène, auquel s'ajoutent les 100 premières bases de ce même exon). Cette région semble contenir les éléments constituant un promoteur minimal. Le TSS, positionné au niveau de la première base de l'exon 1, définit une région 5'UTR (UnTranslated Region) de 239pb, interrompue par un intron de 136pb en amont du site de démarrage de la traduction (ATG) de *Ngn3*. La séquence codante de *Ngn3* est composée de 642 nucléotides et code une protéine de 214 acides aminés.

Un autre moyen de déterminer un TSS est la consultation des banques d'EST (dbEST <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>). Dans le cas de *Ngn3*, un ADNc (GB: BY708009) répertorié dans cette banque a été obtenu par la transcription inverse d'un ARNm mature (en 5' CAP ou coiffe 7-methylguanine). La présence de ce nucléotide particulier assure que l'extrémité 5' de l'EST est complète et possède le premier nucléotide transcrit, ce qui a permis de localiser la position exacte du TSS.

2.2.4 Localisation chromosomique

La localisation de *NEUROG3* (humain) a été déterminée au laboratoire par criblage d'hybrides somatiques irradiés. Cette méthode exploite la capacité des cellules de hamster d'intégrer de façon stable 20 à 30% des fragments chromosomiques exogènes. La fréquence de fragmentation du génome humain irradié aux rayons X est proportionnelle à la dose d'irradiation et sert ainsi de mesure statistique de la distance inter-marqueurs (distance

exprimée en centiray cR). Le criblage par PCR de l'ADN génomique extrait de chacune des cellules hybrides (GeneBridge 4 Human/Hamster RH Panel ; Invitrogen) a permis de localiser le gène *NEUROG3* sur le chromosome 10-bras long q à la position 21.3 (10q21.3) (données personnelles Philippe Ravassard).

(iii) Il est maintenant possible d'avoir accès à la position précise (au nucléotide près), de *Ngn3*, *Relax* et *NEUROG3* sur les cartes chromosomiques de la souris, du rat et de l'homme, respectivement par localisation *in silico* (**Figure 6**). Grâce à l'obtention des séquences complètes des différents génomes. Au début du projet, en 1997, l'accès aux informations du séquençage systématique des génomes humain (*Homo sapiens*, février 2000 réf : [Nature 409,860-921](#)), de la souris (*Mus musculus*, décembre 2002 réf : [Nature 420, 520-62](#)) et du rat (*Rattus norvegicus*, avril 2004 réf : [Nature 428, 493-521](#)) n'étaient pas encore disponibles.

2.3 Les propriétés de RELAX

Pour démontrer que RELAX est un facteur de transcription de la famille bHLH, il a fallu vérifier que cette protéine répond aux caractéristiques suivantes : **(i)** la présence dans sa séquence protéique d'un motif bHLH fonctionnel ; **(ii)** sa capacité à moduler spécifiquement la transcription d'un gène ; **(iii)** une localisation nucléaire.

RELAX possède-il ces trois propriétés?

L'analyse *in silico* de la séquence protéique déduite de la séquence de l'ADNc d'origine (GenPept [NP_067732](#)) a permis d'établir les caractéristiques physicochimiques de RELAX, ses domaines fonctionnels putatifs et la probabilité d'une localisation nucléaire de RELAX.

2.3.1 Le domaine basique de RELAX/ liaison à une boîte E

La détermination des propriétés physico-chimiques (**Tableau 3**) de RELAX a mis en évidence un domaine riche en résidus basiques, localisé entre les acides aminés 55 et 110, attenant au motif conservé HLH (111-136).

La comparaison de cette séquence à celle des autres bHLH neuronaux a révélé dans cet ensemble une forte conservation pour une région de 12 acides aminés (domaine 83 à 110) qui contient les résidus conservés responsables de la liaison directe avec l'ADN (Ferre-D'Amare *et al.*, 1993; Ellenberger *et al.*, 1994; Bertrand *et al.*, 2002).

Afin de confirmer la liaison de la protéine RELAX sur une boîte E de séquence hexanucléotidique consensus CANNTG (Murre *et al.*, 1989). La protéine RELAX recombinante a été produite sous forme étiquetée (Tag en anglais) en fusion avec le peptide FLAG (8 acides aminés). La protéine synthétique RELAX-tag a été purifiée sur une colonne d'affinité (résine couplée à un anticorps anti-FLAG M2).

Son affinité pour une sonde nucléotidique contenant une boîte E et marquée au ^{32}P (nommée "E-box" : ATTCAGAGGC**CAGGTG**CCTGTGACA) a été évaluée par retard de migration sur gel.

Les résultats obtenus ont démontré la capacité de la protéine RELAX de se lier spécifiquement à une boîte E (Ravassard *et al.*, 1997a).

2.3.2 Modulation de l'activité transcriptionnelle par RELAX

La capacité de RELAX à réguler l'activité d'un promoteur a été évaluée par des expériences de transfections transitoires dans la lignée catécholaminergique PC12. Trois vecteurs ont été co-transfectés dans ces cellules :

- ❖ Le plasmide $_{5\text{kb}}$ TH-Luc, dans lequel un fragment de 5,3 kb de la séquence promotrice du gène TH de rat dirige l'expression du gène rapporteur de la luciférase (Luc). Ce fragment possède une boîte E fonctionnelle et module l'activité transcriptionnelle du gène Luc en présence de bHLH dans les cellules PC12 (Ravassard *et al.*, 1997b);
- ❖ Le vecteur $_{\text{pDNA3}}$ -Relax ou $_{\text{pADRS}}$ -Relax/Tag, permettant l'expression de la protéine RELAX fonctionnelle étiquetée (tag) ou non ;
- ❖ Le plasmide normalisateur RSV-CAT (chloramphénicol acétyltransférase) contrôle de l'efficacité de la transfection.

La transfection des cellules avec des quantités croissantes du vecteur $_{\text{pDNA3}}$ -Relax, a démontré une induction de l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène TH,

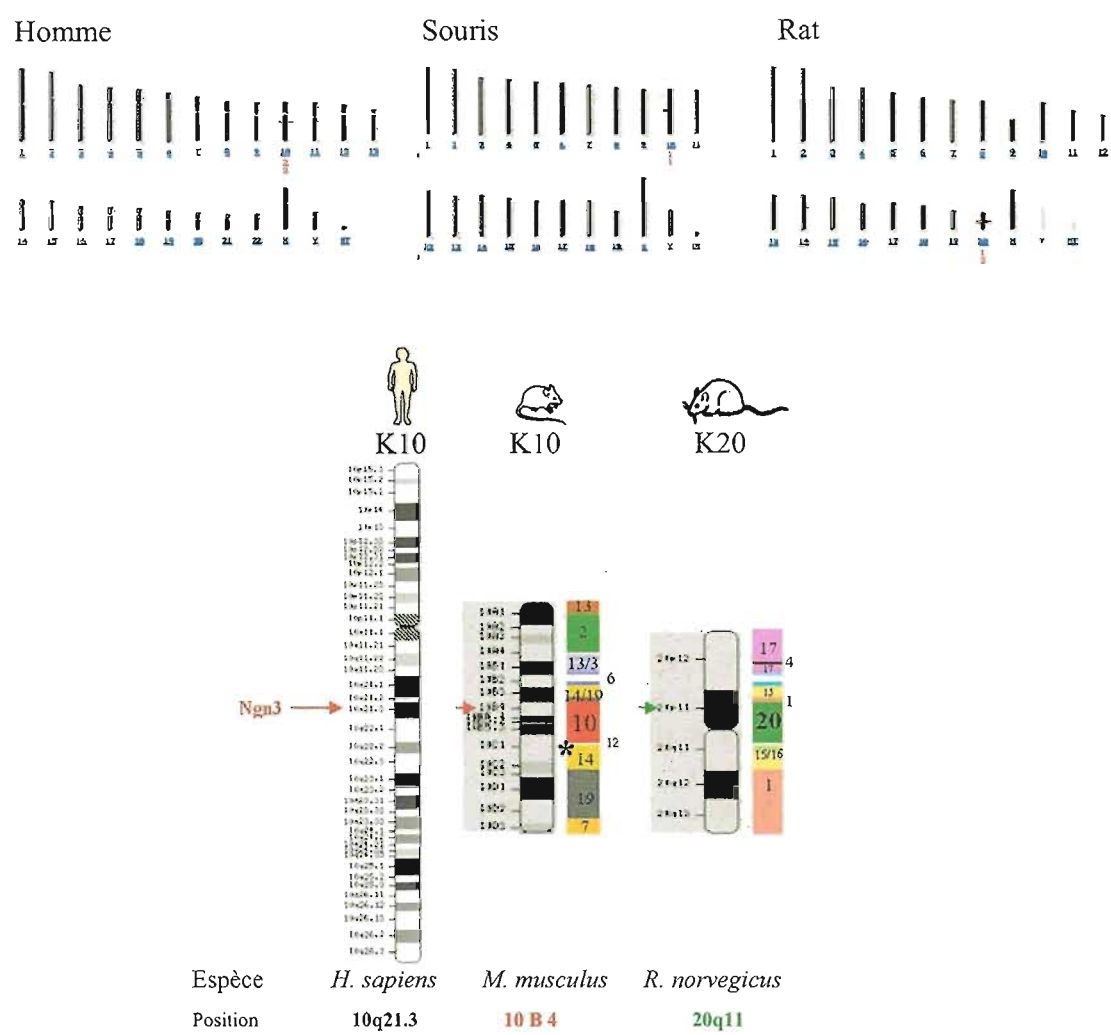


Figure 6 Localisation chromosomique des gènes *hngn3*, *ngn3* et *Relax* dans un même groupe synthénique.

La localisation chromosomique du gène codant neurogénine 3, chez l'homme, la souris et le rat a été obtenue *in silico*. Le gène *ngn3* est localisé sur le chromosome 10 en position B4, le gène *relax* en position 20q11 et le gène *hngn3* sur le chromosome 10 à l'emplacement 10q21.3.

Un **point important** spécifique à la souris est que le groupement synthénique contenant *ngn3* se trouve inséré près de celui contenant le gène *Mash1* (Marqué d'une étoile).



	Nombre d'acides aminés	214 aa
	Masse molaire (Théorique-moyenne)	23,2 kDa
	Point isoélectrique prédit	8,79
	Composition atomique	C ₁₀₀₆ H ₁₅₂₀ O ₃₁₅ N ₃₀₂ S ₆
Composition en acides aminés	Non polaires (G, A, V, I, L, P)	78 36,4%
	Polaires non chargés (S, T, N, Q)	55 25,7%
	Polaires basiques + (K, R, H)	30 14%
	Polaires chargés – (D, E)	22 10,3%
	Aromatiques (F, Y, W)	12 5,6%
	Soufrés (M, C)	6 2,8%
charge globale	Positive (K-R)	11.7%
	Négative (D-E)	10.3%
Répartition des charges		Segment [55-110] chargé positivement
Segment hydrophobe transmembranaire		non

Tableau 3 Description des propriétés de RELAX

La séquence protéique de Relax (GenPept [NP_067732](#)) comporte en son centre le motif conservé HLH précédé d'une séquence riche en résidus basiques. Les caractéristiques physicochimiques de RELAX sont listées dans ce tableau.

proportionnelle à la quantité de plasmide d'expression RELAX. RELAX est donc capable d'induire l'activité du promoteur TH de façon dose dépendante.

De plus, cette activation nécessite strictement la présence d'une boîte E intacte. En effet, la boîte E réduit de moitié l'activité du gène rapporteur (déjà observée par (Yoon et Chikaraishi, 1992) et abolit l'activation dose-dépendante du promoteur TH par la protéine RELAX (Ravassard *et al.*, 1997a).

Ces deux données sont de forts arguments en faveur de la fonction de régulateur transcriptionnel pressentie pour RELAX.

2.3.3 Localisation nucléaire

Il est possible de prédire la localisation subcellulaire d'une protéine *in silico*, en soumettant sa séquence à des algorithmes de prédiction basés sur l'analyse de la composition en acides aminés de la protéine testée. Dans le cas de RELAX, plusieurs logiciels de prédiction tels que PLOC¹, PSORTII Prediction² ou loctree LOCSVMpsi³, ont conclu d'une prédiction nucléaire de 69,6%. Ce résultat est renforcé par la présence de 11,7% de résidus basiques et un motif discriminant de localisation nucléaire RRKK en position 84-87.

Le même système cellulaire de transfections permet de mettre en évidence une localisation nucléaire de Relax par détection immuno-histochimique de l'étiquette (données personnelles). L'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre NGN3 a confirmé la localisation nucléaire de celui-ci (Zahn *et al.*, 2004).

2.3.4 Existe-t-il d'autres domaines protéiques d'intérêts?

De nombreux outils bioinformatiques sont disponibles pour déterminer au sein d'une séquence protéique d'intérêt, la présence de motifs déjà connus et susceptibles d'être à l'origine d'interactions protéiques avec d'autres éléments. Ce type de prospection conduit à l'identification de nombreux domaines putatifs, dont la pertinence s'avère difficile à évaluer.

¹ PLOC (Protein localization prediction-Park & al, 2003)- <http://www.genome.jp/STT/plocdir/>
² PSORTII-Prediction (Horton et Nakai 1999)- <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html> et <http://psort.nibb.ac.jp/helpwww2.html>
³ Loctree LOCSVMpsi (Xie D et coll. 2005)- <http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/loctree/query>

A l'exception de la séquence bHLH que l'on trouve conservée dans tous les facteurs de transcription de cette famille, seuls quelques rares motifs ont été caractérisés expérimentalement et proviennent d'expériences de criblages fonctionnels dans la levure ou *in vitro* par transfections transitoires. Notamment, le criblage par la méthode de double hybride d'une banque d'ADN préparée à partir de spermatogonies aux stades P1 et P7 a mis en évidence une interaction entre NGN3 et le domaine bHLH de E12 utilisé comme appât (Yoshida *et al.*, 2004).

La formation d'hétérodimères NGN3/E47 a été démontrée *in vitro*. Ces hétérodimères coopèrent avec des protéines à homéodomaine HNF pour "hepatic nuclear factor" pour réguler l'expression des gènes *HNF1α* (Smith *et al.*, 2003), , *HNF1β* (Smith *et al.*, 2004) et *HNF3β/FoxA* (Choi *et al.*, 2003). L'ensemble de ces trois études, semble indiquer que dans la seconde moitié de la protéine NGN3 (76-214-C terminale) se trouve un domaine d'activation transcriptionnelle. Les interactions de NGN3 (région 76-131) avec HNF3β ou HNF1α/β ont pour conséquence une synergie de l'activation transcriptionnelle des gènes *Pax4* et *Nkx2.2* dans des systèmes cellulaires *in vitro*.

La modulation de la transcription des gènes possédant des boîtes E requiert la présence des coactivateurs CBP (CREB-binding protein) et p300 (Eckner *et al.*, 1996; Mutoh *et al.*, 1998) ; Ces facteurs sont activés en cas de variation de leur état de phosphorylation, suite à l'activation de voies de transduction spécifiques faisant intervenir notamment des protéines à activité serine/thréonine kinase telles que les AKT. Or un motif putatif de liaison de la protéine AKT, RNRPKSE, est présent sur la protéine neurogénine 3 en position 67-74 (Datta *et al.*, 1999). De plus, (Vojtek *et al.*, 2003), ont constaté que la présence du facteur AKT1 a pour conséquence une augmentation de l'expression d'un gène rapporteur possédant une cible de reconnaissance de *Ngn3*. Cette coopération permettait le recrutement et l'activation de CBP/p300 en lien avec la machinerie de transcription.

L'identification des partenaires de NGN3 permettra de disséquer les modes de régulation pré-transcriptionnelle liés au recrutement de ce facteur et des autres acteurs de la machinerie de transcription.

2.4 Patron d'expression de Relax/Ngn3

La compréhension de la fonction d'un gène débute souvent par l'étude du patron d'expression de celui-ci. Dans le cas, Le patron d’expression spatio-temporel des gènes exprimés à des stades clés du développement est une indication précieuse pour la compréhension de leur fonction.

Les informations collectées sont d'autant plus riches lorsque le patron d'expression met en évidence un profil non ubiquitaire particulier, comme celui de certains bHLH spécifiques participants aux étapes de la neurogenèse. Certains de ces facteurs de transcription, comme MASH1 ou les neurogénines sont exprimés très tôt par les précurseurs neuronaux au niveau de la zone ventriculaire, alors que d'autres, tels que NEUROD, sont synthétisés plus tardivement par des cellules post-mitotiques (Kageyama et Nakanishi, 1997; Lee, 1997; Bertrand *et al.*, 2002; Wilson et Maden, 2005).

Afin de faciliter la lecture du profil temporel d'expression entre les différentes espèces étudiées, le tableau suivant (**Tableau 4**) compare, en fonction des stades Carnegie, les stades de développement entre la souris (Theiler 1972) et le rat (Witschi et Growth 1962).

Stade Carnegie	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Souris (Jours)	9	9.5	10	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16
Rat (Jours)	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16	16.5	17	17.5

Tableau 4 Corrélation entre les stades embryonnaires chez le rat et la souris (post-fécondation).

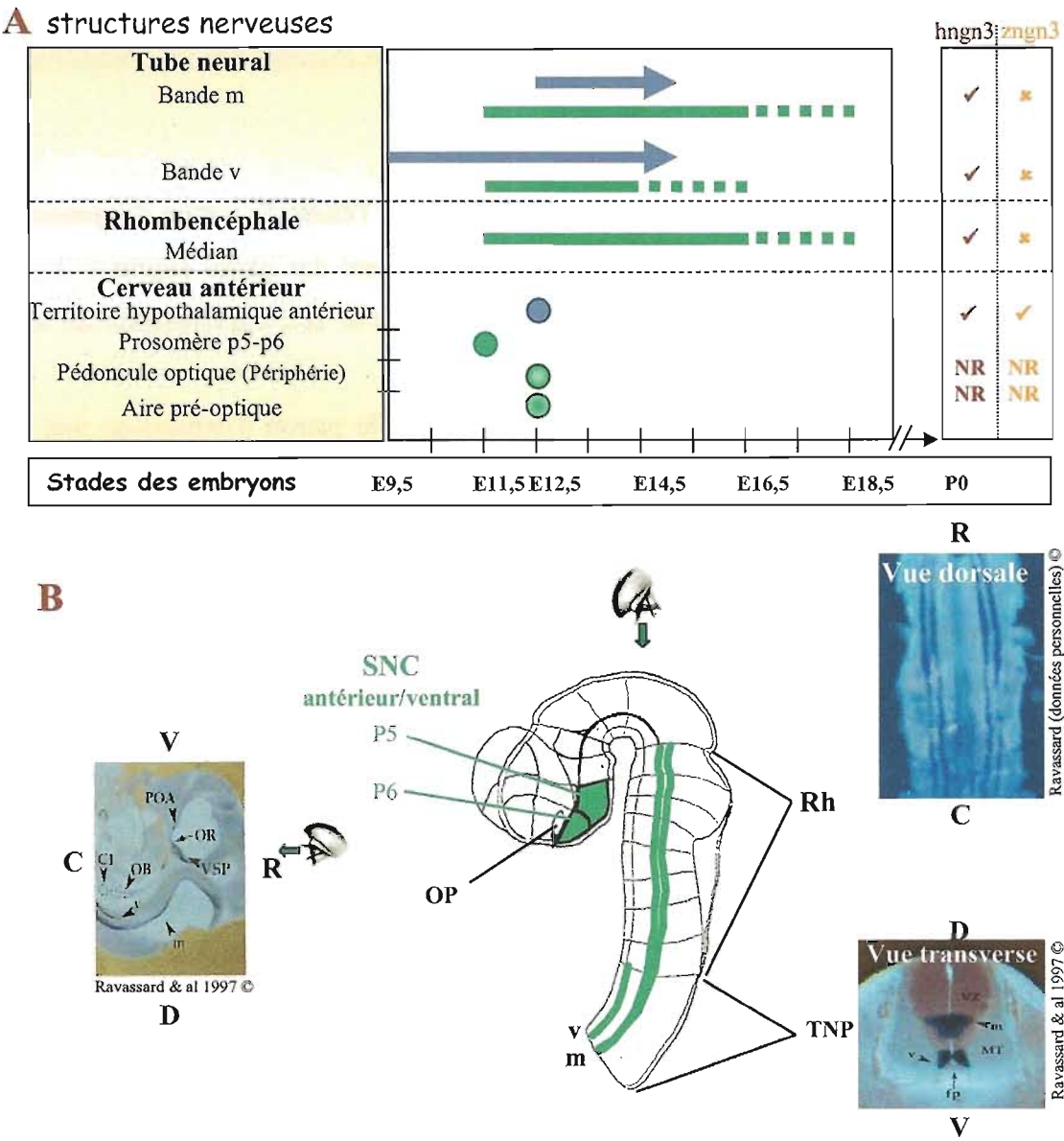


Figure 7 Patron d’expression dans le Système Nerveux Central de **ngn3/Relax/hngn3/Zngn3**

(A) Fenêtre d’expression temporelle

Les pointillés représentent des fenêtres temporelles au cours desquelles l’expression débute ou décroît. Les flèches aux extrémités traduisent l’absence de données quant à l’expression des ARNm aux stades entourant le stade embryonnaire étudié. Les cercles pleins matérialisent l’information obtenue sur un stade précis.

(B) Représentation schématique des domaines d’expression de Relax/ngn3

Antérieurement la bande v s’interrompt au niveau du primordium de la première vertèbre cérébrale, limite entre la notocorde et la plaque précordale. En revanche, la bande m se prolonge dans le rhombencéphale à l’aplomb du pédoncule optique.

Les patrons d’expression de **Relax** sont représentés en **Vert**; de **ngn3** en **Bleu**; de **hngn3** en **Rouge** et de **zngn3** en **Jaune**.

(D’après Sommer et al.(1996); Lee (1997); Ravassard et al. (1997) et données personnelles; Wang et al. (2001)).

2.4.1 Système Nerveux Central

La protéine NGN3/RELAX est exprimée de manière transitoire chez l'embryon, sans réexpression chez l'adulte. La **Figure 7** résume les principales informations publiées concernant les fenêtres d'expression temporelle de *Ngn3*.

2.4.1.1 Chez les muridés : *Mus musculus* et *Rattus norvegicus*

Le patron d'expression neural des ARNm *Ngn3/Relax* le plus précis a été déterminé chez les muridés par hybridation *in situ* (HIS).

- ❖ **Dans le cerveau antérieur**, chez la souris, seule une expression restreinte de *Ngn3* dans le cerveau antérieur a été décrite. Elle se limite à l'hypothalamus (zone latérale proche de la ligne médiane du III ventricule) à E12 au dessus du territoire hypophysaire présomptif. Ce territoire d'expression est neurogénine 3 exclusif.

Le patron d'expression de Relax est plus détaillé : le premier territoire d'expression de Relax à E11.5 est situé dans la région ventrale du prosencéphale secondaire, au niveau de deux territoires délimités nommés les prosomères p5 et p6.

A E12.5, Relax est exprimé dans deux autres territoires plus discrets, localisés autour du pédoncule optique et au niveau de l'aire pré-optique (rostrale). Cependant aucun marquage Relax n'a été observé dans le pédoncule optique.

- ❖ **Dans le Tube Neural médullaire (TNm)**, les premières cellules exprimant l'ARNm de *Ngn3* (*ngn3*⁺) sont détectées dès les stades E9,5j (souris) et 11,5 (rat), dans la région ventrale (bande v) du tube neural proche de la plaque du plancher, exclusivement dans la zone ventriculaire (ZV). Ce territoire d'expression formé de deux bandes latérales symétriques est à l'origine de la dénomination initiale de Relax chez le rat.

Un deuxième territoire plus médian (bande m) que le premier est détecté au niveau du sillon de HIS (*sulcus limitans*). Il chevauche les territoires d'expression de *ngn1et2* (Sommer *et al.*, 1996a; Lee, 1997; Ravassard *et al.*, 1997a).

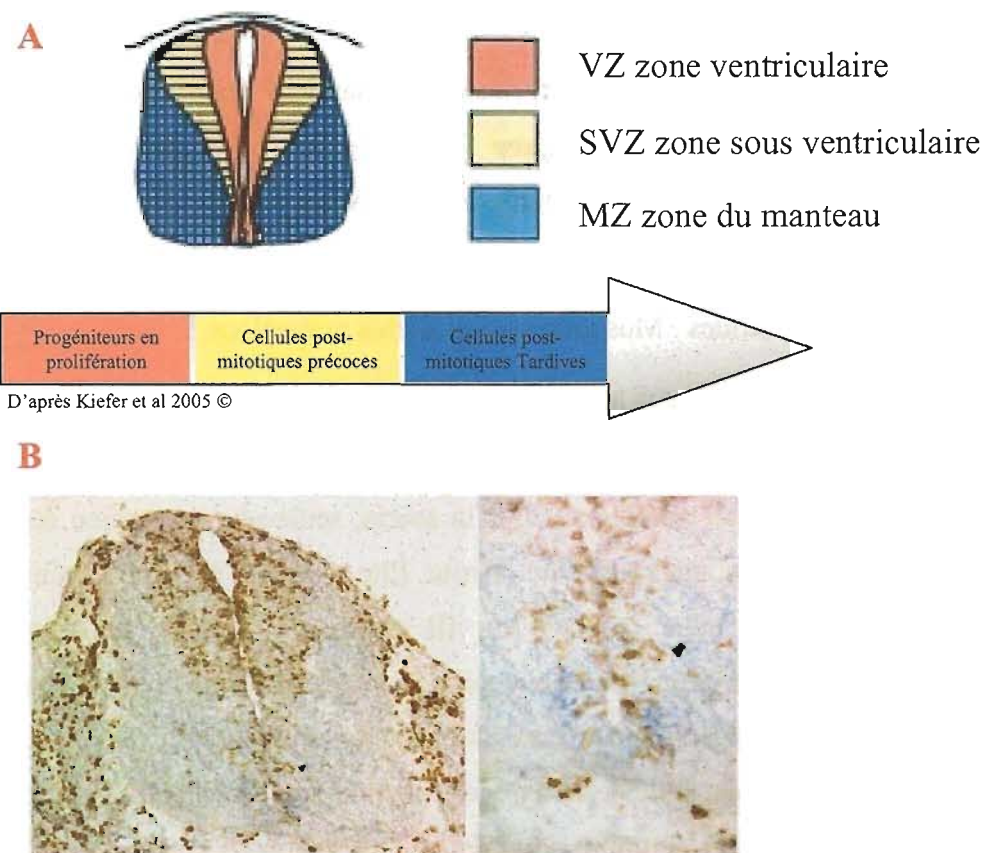


Figure 8 Localisation restreinte des cellules exprimant *ngn3* dans la zone de prolifération des progéniteurs neuronaux du Tube neural postérieur

(A) Organisation du neuroépithélium

Il existe une régionalisation du tube neural de la zone ventriculaire (qui contient les progéniteurs les plus immatures) vers la périphérie du neuroépithélium ou manteau (qui contient les cellules engagées dans une voie de différenciation). Ainsi un progéniteur immature va quitter la zone ventriculaire pour se différencier dans la zone du manteau. La conséquence est un épaissement du neuroépithélium.

(B) Co détection *ngn3*/BrdU dans la région de la moelle épinière

Par hybridation *in situ* (sonde *ngn3* révélée en bleue) et marquage immunohistochimie (brun-DAB) anti-BrdU sur cryosection (coupe transversale).

La prolifération cellulaire est évaluée par une injection de BrdU ("pulse" de 2 heures).

Les cellules proliférantes ayant effectuées une réplication de leur ADN (phase S du cycle cellulaire) ont incorporé les uridines modifiées (brdU) reconnues comme épitope par un anticorps anti-BrdU.

Les cellules $ngn3^+$ se trouvent toujours confinées dans le neuro-épithélium bordant la lumière du tube neural (zone ventriculaire—**Figure 8a**). Cette région étant une zone de prolifération de progéniteurs, l'état de division cellulaire du tissu environnant les cellules exprimant Relax a été analysé par incorporation de bromo-désoxyuridine (BrdU). Les cellules en division ayant incorporé du BrdU expriment très rarement d'ARNm *Ngn3*, alors qu'elles se trouvent précisément dans la zone de prolifération (**Figure 8b**). Ce résultat suggère que l'expression de *Ngn3* est une cause ou une conséquence de l'arrêt de prolifération.

- ❖ **Au niveau du rhombencéphale**, seul le profil d'expression de Relax a été décrit. Il s'agit du prolongement de la bande médiane de Relax de la moelle épinière jusqu'à la partie antérieure du cerveau postérieur (bande m). La fenêtre d'expression de Relax se situe entre les stades E11.5 et E18.5 (Ravassard *et al.*, 1997a).

Dans le rhombencéphale, les deux bandes longitudinales prolongeant les bandes m issues de la moelle épinière se divisent en deux (données personnelles Ph. Ravassard—**Figure 7b**).

Tout comme dans la moelle épinière la localisation des cellules exprimant Relax est restreinte à la zone ventriculaire et rares sont les cellules $Relax^+$ ayant incorporé du BrdU.

2.4.1.2 Patron neuronal de *Ngn3* dans d'autres espèces

Chez l'Homme. Le peu d'informations collectées sur le patron d'expression de *NEUROG3* chez l'embryon humain tient essentiellement à la difficulté d'obtention des tissus embryonnaires humains. En France, la loi n°75-17 dite la loi Veil votée le 17 janvier 1975 a autorisé l'Interruption Volontaire de Grossesse ou IVG dans un cadre médical jusqu'à la dixième semaine de développement, et une révision récente de cette loi (4 juillet 2001) a repoussé ce délai jusqu'à douze semaines. La légalisation de l'IVG a permis aux chercheurs et médecins d'avoir accès à des tissus embryonnaires et fœtaux (la terminologie fœtus est réservée à l'embryon humain à partir de la huitième semaine de développement).

Ces précieux tissus ont été collectés après consentement des patientes à la suite d'une intervention médicale d'IVG dans le service de gynécologie obstétrique du Pr. Jean-François OURY à la maternité de l'Hôpital Robert Debré et disséqués dans le laboratoire de Raphaël

Scharfmann (ancienne unité INSERM U457 devenue EMI 0363). L'âge gestationnel (exprimé en Semaine Gestationnelles SG) des embryons/fœtus est estimé selon le stade de développement des ébauches de membres pour les embryons âgés de moins de neuf semaines de gestation, et selon la taille du pied pour les embryons de plus de neuf semaines de gestation (Munsick, 1984). De plus, la fragilité de certaines structures embryonnaires provenant d'IVG, notamment celles du SNC et plus particulièrement du cerveau antérieur, ne nous a pas permis d'évaluer de façon précise le patron de *NEUROG3* dans ces structures.

Toutefois, dans la moelle épinière et le cerveau postérieur, les patrons d'expression de *NEUROG3* sont identiques à ceux observés chez le rat ou la souris. Nous avons eu accès à des embryons âgés de 6.5 SG à 11.5SG, fenêtre pendant laquelle l'expression de *NEUROG3* se trouve localisée dans les mêmes territoires que chez la souris (Ravassard, données personnelles). L'intervalle d'expression temporelle n'est pas connu. Cependant l'expression de *NEUROG3* est beaucoup plus massive pour les stades précoces (6.5SG) auxquels nous avons eu accès. A ce stade, l'intensité du marquage de la bande médiane est relativement faible et n'est presque plus perceptible à des stades plus tardifs. Au vu de ces observations, il est raisonnable de penser que le maxima d'expression de *NEUROG3* dans le tube neural se situe avant 6,5SG.

Chez un Gallinacé (*Gallus gallus*). Aucune banque ne fait état de l'existence de la séquence codante de *cNgn3* chez le poulet. Ce modèle aviaire est très couramment utilisé, notamment pour effectuer des expériences de surexpression *in vivo* (électroporations *in ovo*). Un fragment de la séquence codante pour l'homologue gallinacé de neurogénine3, *cNgn3* (donnée par Anne Grapin-Botton, ISREC, Lausanne) a été obtenu auprès de Jean-Marc Matter (Unité Oculogénétique, Hôpital Ophtalmique Jules Gonin, Lausanne), nous a permis de démontrer que le patron de *cNgn3* est proche de celui observé chez les mammifères.

Chez un cyprinidé (*Danio rerio*). L'étude de l'expression de *zNgn3* au cours de la différenciation du tube neural chez le poisson zèbre a mis en évidence l'absence de ce facteur dans les territoires conservés entre l'homme et les rongeurs au niveau la moelle épinière et du rhombencéphale (Wang *et al.*, 2001). Chez le *Danio rerio*, la présence d'ARNm *zNgn3* est

détectée à partir du stade 24 heures post fertilisation (hpf), dans une région très restreinte du diencéphale antérieur en position ventrale, vraisemblablement associées au *primordium* hypothalamique. Ce résultat est confirmé à 48hpf par la détection de trois foyers *ngn3*⁺ au centre de l'hypothalamus. Il s'agit du seul territoire neurogénine 3 décrit actuellement. L'expression de *zNgn3* est fugace. En effet, le niveau d'expression décline à partir de 48hpf et n'est plus détectable par RT-PCR à 72hpf.

2.4.2 Épithéliums pancréatique et digestif

Contrairement aux deux autres constituants neurogénines 1 et 2, le troisième membre murin de cette famille neurogénine 3 est aussi fortement exprimé dans le pancréas (Sommer *et al.*, 1996a; Lee, 1997; Gradwohl *et al.*, 2000) (**Voir Figure 9**).

Épithélium

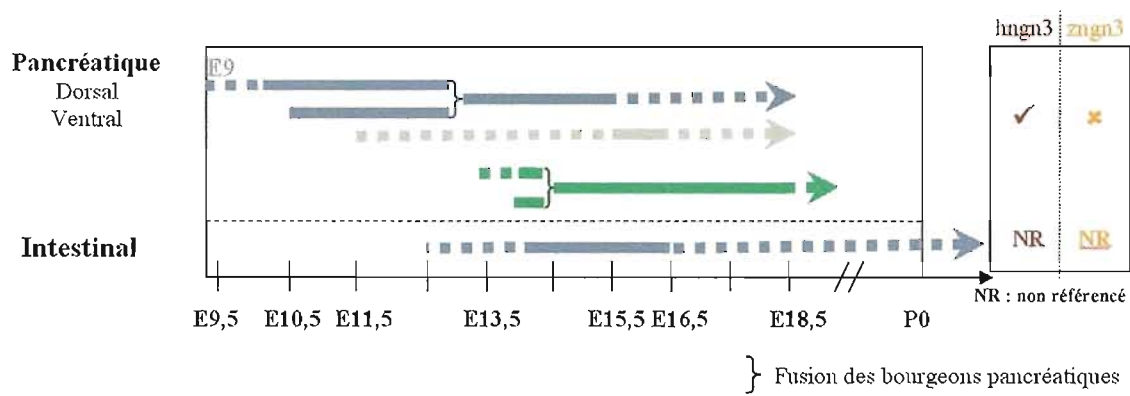


Figure 9 Fenêtre d'expression de *Ngn3* dans les épithéliums pancréatique et digestif

Chez la souris, l'expression de l'ARNm de *Ngn3* débute dans le territoire pancréatique dès le stade E9 (14 somites). Au stade de 25 somites (équivalent à E9.5j), quelques cellules synthétisant les ARNm *Ngn3*, uniquement dans le bourgeon pancréatique dorsal. Un délai de 24 heures est nécessaire à l'apparition des premières cellules *ngn3*⁺ dans le bourgeon ventral (Apelqvist *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2000a), bien avant la fusion des bourgeons qui a lieu à E13 chez la souris (Pictet *et al.*, 1972).

Par la suite, le nombre de cellules exprimant l'ARNm de *Ngn3* augmente pour atteindre un pic à 15.5j. Passé ce stade, le nombre de cellules produisant ce facteur de transcription diminue

jusqu'à la complète extinction de l'expression de *Ngn3* dans le pancréas adulte (Gradwohl *et al.*, 2000; Schwitzgebel *et al.*, 2000). Les cellules marquées sont situées majoritairement au centre de l'épithélium ou associées/adjacentes aux cellules ductales, souvent regroupées. Il est intéressant de noter qu'aucune cellule exocrine (Gradwohl *et al.*, 2000) ou acinaire n'exprime l'ARNm de *Ngn3* (Jensen *et al.*, 2000a).

Chez le rat, l'expression de Relax débute à E13,5 dans l'épithélium pancréatique (Duvillie *et al.*, 2006). Le nombre de cellules synthétisant Relax au cours du développement de l'épithélium pancréatique augmente pour atteindre un plateau à E16,5-E18,5. Ce nombre décroît ensuite (Duvillie *et al.*, 2006).

Un marquage similaire de *NEUROG3* est observable dans l'épithélium pancréatique embryonnaire humain en association avec des structures ductales dans les pancréas d'embryons/fœtus âgés de 6,5 à 9,5 SG (Ravassard communication personnelle).

Il est important de noter que, dans l'épithélium pancréatique, aucune cellule *ngn3*⁺ n'exprime le marqueur de prolifération Ki 67. De même, les cellules exprimant l'ARNm *Ngn3* n'incorporent que très rarement le BrdU (données personnelles Myriam Attali).

Dans l'endoderme du tube digestif, un marquage discret des ARNm de *Ngn3* est détectable dès E12.5 chez la souris dans des cellules isolées. Le nombre de cellules *ngn3*⁺ est plus important dans le duodénum que dans le colon ce qui reflète la morphogenèse rostro-caudal de l'épithélium intestinal (Jenny *et al.*, 2002). Le maximum d'expression des ARNm *Ngn3* se situe entre E14.5 et E15.5. Enfin, les cellules *ngn3*⁺ n'expriment aucun marqueur de cellules différenciées tel que la Chromogranine A (Jenny *et al.*, 2002).

Contrairement au patron d'expression embryonnaire de *Ngn3* dans le SNC, les ARNm de *Ngn3* sont exprimés chez l'adulte dans l'intestin grêle, en dehors des villosités intestinales. Quelques rares cellules *ngn3*⁺ sont détectables dans les compartiments de prolifération (cryptes) ayant incorporé du BrdU.

2.4.3 Epithélium séminifère

La **Figure 10** donne une vue globale de l'expression de *Ngn3* dans l'épithélium séminifère.

Épithélium

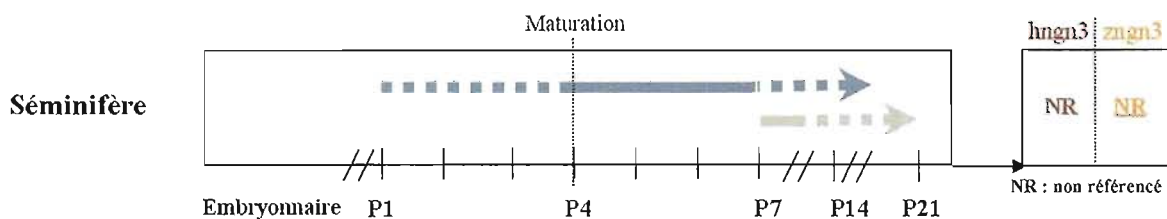


Figure 10 Patron d'expression de *Ngn3* dans l'épithélium séminifère

Au cours du développement, l'expression de *Ngn3* n'est pas détectable aux stades embryonnaires. Les premiers ARN *Ngn3* sont détectés au stade post-natal P1 dans des extraits testiculaires. Le maximum de signal est obtenu à P7 et décline rapidement à P14 pour n'être plus observable par la suite. La présence de quelques cellules situées à la base de la membrane basale du tube séminifère est visualisable à P7. Morphologiquement ces cellules ressemblent à des pré-spermatogonies (Yoshida *et al.*, 2004).

Chez l'adulte, le patron d'expression de neurogénine 3 est restreint à une faible proportion de cellules (noyaux aplatis) localisées à la périphérie du tube séminifère, proche de la membrane basale. Le nombre de cellules *ngn3*⁺ s'accroît au cours du développement du tube séminifère (stade VII-VIII). Ces cellules semblent être des spermatogonies pré-pubères, plus nombreuses pendant les stades VII et VIII de maturation du tube séminifère. La présence de cellules *ngn3*⁺ en mitose reste très occasionnelle.

2.4.4 Distribution protéique de neurogénine 3

La détermination de la séquence de RELAX a permis de sélectionner des peptides afin de produire des anticorps spécifiques dirigés contre cette protéine. Nous avons peu de recul sur les caractéristiques des différents anticorps dirigés spécifiquement contre NGN3. Le **Tableau 5** donne un résumé des différentes stratégies de productions (choix des peptides, hôtes producteurs) ainsi que les tissus explorés

Chez la souris, la protéine NGN3 est détectée à partir de E11.5, soit environ 60 heures après la transcription des premiers ARNm *Ngn3*. A E12.5 NGN3 est synthétisé dans les cellules

Anticorps	Epitopes	Peptides	Hôtes	Tissus testés	Détection	Références
Polyclonal	Souris	95 aa N-ter Fusion GST	Lapin/ Cobaye	Pancréas murin embryonnaire	Immunohistologie Ic; If	Schwitzgebel & coll. 2000
			Lapin	Tube digestif murin embryonnaire	Immunohistologie Ic	Lee & coll 2001
			Lapin	Ilots et cellules ductales pancréas humains adultes adéno-transduites	Western blot, Immunohistologie If	Heremans & coll. 2002
			Cobaye	Tube digestif murin adulte	Immunohistologie Ic; If	Jenny & coll. 2002
Polyclonal	Rat	21 aa N-ter Injecté avec KLH°	Poule (œufs)	Moelle épinière murine embryonnaire	Immunohistologie Ic	Ravassard données personnelles
Monoclonal	Souris	95 aa N-ter Fusion GST	Souris	Pancréas murin embryonnaire	Immunohistologie If	Zahn & coll. 2004
Polyclonal	Souris	aa.n°80-93 en N-ter	Lapin	Tissus rongeurs et humains	Immunohistologie Ic	Chemicon 2002
Monoclonal	Souris	aa n°9-148 en N-ter	Souris	Tissus rongeurs et humains	Western blot, Immunohistologie If	BD biosciences 2004
Polyclonal	Souris	aa n° 1-80	Lapin	Tissus rongeurs	Wb, IF	Santa Cruz biotechnology
	Humain			Tissus humains		
	Souris	extrémité N-ter	Chèvre	Tissus rongeurs		
	Humain	Extrémité C-ter		Tissus humains		

Abréviations KLH Keyhole Limpet Hemocyanine; aa acides aminées; GST glutathion S transferase; Ic Immunohistochimie ; If Immunofluorescence ; N-Ter amine terminale; Wb western blot.

Tableau 5 Récapitulation des anticorps dirigés contre neurogénine 3

En grisé sont notés les anticorps commerciaux actuellement disponibles sur le marché.
Cependant aucune publication ne fait état de la caractéristique de ces anticorps sur des structures du système nerveux central.

localisées au centre de l'épithélium pancréatique. Le niveau maximum d'expression de la protéine ne correspond à celui de l'ARNm, c'est-à-dire entre E15.5 et E 16,5 (Sabate *et al.*, 1995a; Schwitzgebel *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Schonhoff *et al.*, 2004). La production de NGN3 décline ensuite jusqu'à E18.5, pour ne plus être exprimé chez l'adulte.

Il est intéressant de noter la présence de ce facteur de transcription dans le noyau de certaines cellules ductales, et occasionnellement périductales, dans le tissu pancréatique d'embryons de souris à E15.5 (Schwitzgebel *et al.*, 2000). A ce même stade, NGN3 est détecté dans l'épithélium intestinal, dans le noyau de quelques rares cellules (Lee *et al.*, 2001). Chez la souris adulte, un marquage identique est obtenu dans l'épithélium intestinal au niveau des cryptes (Jenny *et al.*, 2002).

Dans le tube séminifère, chez la souris, les premières cellules synthétisant NGN3 sont visibles à P7 (spermatogonies uniquement). Le marquage diminue alors jusqu'à P21, où quelques cellules sont encore détectées. Un faible marquage est observable au niveau de quelques spermatocytes (Raverot *et al.*, 2005).

Récemment, en 2004, Zhan et coll ont publié le premier anticorps monoclonal dirigé contre le même peptide amino-terminal que celui provenant du laboratoire de Michael S. German et dont le patron pancréatique est rigoureusement identique (Schwitzgebel *et al.*, 2000), (Zahn *et al.*, 2004).

En résumé, le profil d'expression de *Ngn3* est restreint à la zone ventriculaire de certains territoires du système nerveux central, ainsi qu'aux épithélia séminifères, pancréatiques, digestifs. De plus, les intervalles de temps pendant lesquels *neurog3* est présent coïncident avec les phases de spécification des cellules qui l'expriment.

Une forte conservation du territoire d'expression hypothalamique est observée au cours de l'évolution. En effet, chez le poisson zèbre le patron d'expression de *zNgn3* qui est plus réduit que chez les mammifères, conserve une unique expression restreinte au diencephale antérieur ventral contribuant aux structures hypothalamiques (Wang *et al.*, 2001).

A



* Le caractère majoritaire est 100% identique
: Le caractère majoritaire est représenté entre 50 et 85%;
souvent substitué sans modification de charge
≤50%. Il existe plusieurs substitutions;
souvent sans conservation de charge

B

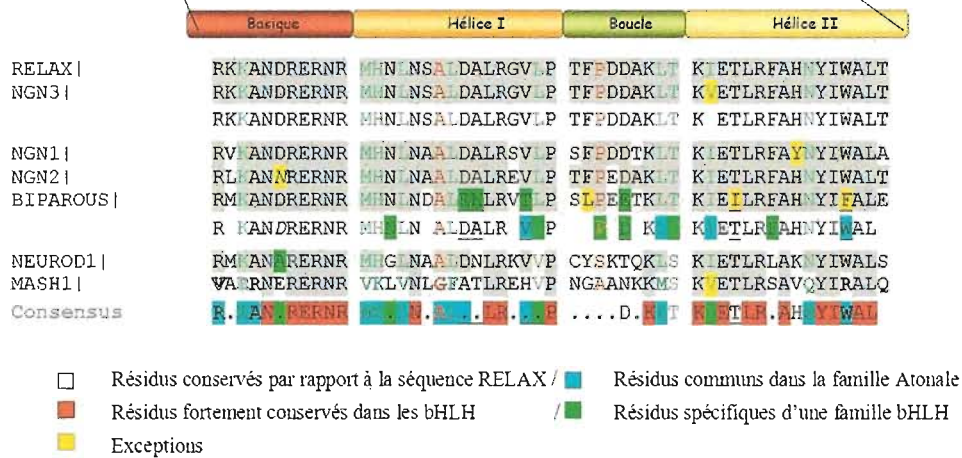


Figure 11 Alignement de séquences global (A) et zoom de la région bHLH (B) des premiers membres de la famille des neurogénines.

- (A) **Lignes 1 à 3:** Alignement de RELAX et NGN3 respectivement isolés chez le rat et la souris. La 3^e ligne indique les acides aminés conservés soit 94,4% d'identité pour l'ensemble des séquences protéiques et de 100% pour le motif bHLH.
- Lignes 4 à 7:** Alignements de RELAX, NGN1 & 2 et BIPAROUS respectivement isolés chez le rat, la souris et la drosophile. La 7^e ligne indique les acides aminés conservés. Les identités protéiques sont ici plus faibles : 67% avec NGN1 ; 75% avec NGN2 ; 64% avec BIPAROUS.
- Lignes 8 à 10:** Alignements de RELAX (séquence de rat), NEUROD1 et MASH1 (séquence de souris). La 8^e ligne indique les acides aminés conservés entre tous les alignements. L'identité protéique de RELAX et NEUROD1 est de 66 %.
- L'identité devient encore plus faible avec MASH1 : 39 %.
- (B) Agrandissement de l'alignement du domaine bHLH

2.5 Appartenance à une famille de protéines : les neurogénines

2.5.1 RELAX, neurogénines & co.

La comparaison des séquences des premiers membres de la famille des neurogénines (**Figure 11**) révèle non seulement un motif bHLH conservé entre RELAX et les ngns mais surtout une identité protéique de 94,4%, entre RELAX et NGN3.

Pour recenser l'ensemble des membres de la famille neurogénine, Ledent et al. (2002) ont effectué une recherche itérative sur les banques de donnés. Actuellement, la famille des neurogénines se compose de 24 membres (Ledent *et al.*, 2002; Rebeiz *et al.*, 2005).

Leur classification se subdivise en trois groupes représentés par les trois neurogénines murines (paralogues ngn1, 2, 3). Peu de NGNs non mammifères ont été caractérisées dans d'autres espèces que les mammifères au même titre que les bHLH dans leur globalité. Une divergence est clairement visible entre le taxon des mammifères et les homologues des autres taxons.

2.5.2 Neurogénines, ARP ou famille indépendante

Le classement simple des protéines bHLH exprimées dans le système nerveux en deux familles distinctes, achaete/scute ou atonal, a évolué en partie grâce au classement des neurogénines.

Dans un premier temps, la comparaison des domaines conservés (bHLH) de Relax avec ceux des autres bHLH a indiqué une appartenance de RELAX à la famille ARP (identité plus marquée pour MATH1 (57%) que pour MASH1 (40%) au même titre que ses homologues NGN1/MATH4C/NEUROD3, NGN2/MATH4A et NGN3/MATH4B/ATO5 isolés chez la souris (Gradwohl *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1996; Sommer *et al.*, 1996a; Cau *et al.*, 1997).

Cependant les arguments suivants suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une nouvelle sous-famille bHLH distincte :

- ❖ les séquences situées en dehors du domaine bHLH, sont très peu conservées entre les neurogénines et les autres membres de la famille atonal (à *fortiori* pour les membres AS-C) ;
- ❖ des similitudes existent au niveau des régions situées en dehors des domaines bHLH entre les séquences de RELAX et de la protéine biparous ou TAP, TArget of Poxn (Bush *et al.*, 1996). Les neurogénines sont en fait les orthologues de biparous.
- ❖ l'alignement des domaines bHLH des protéines de type atonal (ARP), NEUROD et NGNs révèle une ségrégation entre ces trois sous groupes, séparant le groupe ARP des NEUROD et des neurogénines (Hassan *et al.*, 2000).
- ❖ Sa fonction diffère aussi de celle d'atonal (Bush *et al.*, 1996) ; (Gautier *et al.*, 1997) ; (Ledent *et al.*, 1998).

2.5.3 Un motif spécifique, une signature discriminante des neurogénines

L'alignement des domaines bHLH des neurogénines, des NEUROD et des membres atonal drosophilien (Figure 11), a conduit à l'identification d'un motif "signataire" propre à la famille neurogénine, qui permet de discriminer ses membres des autres ARP. Ce motif AN[X]RE se situe dans la région basique et permet aussi de faire la distinction entre NGN2 ([X] = N ; motif AN[N]RE) et les autres neurogénines (AN[D]RE : pour NGN1 et NGN3).

Toutefois la seule exception concerne *zNgn3* chez le poisson zèbre dans lequel une substitution du résidu glutamate (E) en un résidu Glycine (G) en position 5 conduit au motif AN[D]RG. Les autres membres de la famille, tels que NeuroD ou les homologues d'atonal, se distinguent dans la plupart des cas par la présence d'un résidu Alanine au cœur de ce motif AN[A]RE.

Ainsi, se dégage le motif suivant **K-A-N-[DN]-R-x (29)-K-x-E**, qui peut être utilisé de façon plus fiable pour cribler des génomes complets non annotés afin d'identifier de nouveaux membres de la famille des neurogénines.

Nous venons d'exposer la classification actuelle dans laquelle s'inscrivent les membres de la famille des neurogénines. De part leur patron d'expression tissulaire restreint et leur absence

d'autres motifs spécifiques, ils appartiennent à la seconde classe de bHLH (classe II). Cependant, jusqu'à présent, la fonction de ces bHLH n'a pas été prise en compte dans cette classification. Les informations collectées de profils d'expression permettent d'établir des hypothèses de travail afin de déterminer leurs fonctions. Nous verrons au cours des prochains paragraphes (voir § 3.2 et 4) que les membres de la famille des neurogénines sont impliqués dans les étapes de détermination engageant un progéniteur vers sa destinée terminale.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la mise en place et le contrôle de l'expression du gène *Ngn3* (objectif de ce projet), il est nécessaire au préalable d'introduire les étapes dans lesquelles il est impliqué à savoir la neurogenèse et la détermination du lignage endocrine du tube digestif (la détermination spermatogonale ne sera pas traitée dans ce manuscrit).

3 bHLH et neurogenèse

La compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la mise en place de l'ensemble des types cellulaires neuronaux constitue un défi majeur de la biologie du développement. L'identification des déterminants moléculaires impliqués dans ces processus représente une étape incontournable à la compréhension de ces mécanismes. Les facteurs de transcription à domaines bHLH interviennent dans la régulation des étapes de détermination et de différenciation cellulaire de nombreux tissus au cours du développement embryonnaire. Il est donc probable qu'ils participent à la régulation du programme neurogénique.

La formation du système nerveux fait appel à de nombreux processus développementaux qui permettent de coordonner et de contrôler la production de cellules neuronales et gliales afin de construire ce tissu hautement complexe et hétérogène.

Chez l'embryon, le *primordium* du système nerveux dérive d'une partie de l'ectoderme embryonnaire. A l'origine, les cellules ectodermales "naïves" de cette couche uniforme sont pluripotentes et identiques. Elles possèdent le potentiel de devenir des cellules nerveuses ou des cellules de la peau (Stern, 1954; Taghert *et al.*, 1984).

L'ensemble des étapes conduisant une cellule ectodermale "naïve" pluripotente vers le destin neural post-mitotique est désigné neurogenèse. Elle se divise en 4 étapes essentielles qui sont:

(i) Définir le territoire neurogénique.

C'est sous l'influence d'une combinatoire de signaux appropriés contenus dans ce territoire qu'une cellule ectodermale "naïve" va acquérir sa **COMPETENCE** à devenir un précurseur neural.

(ii) L'étape de **SPECIFICATION**

La cellule multipotente s'oriente vers la voie de production des progéniteurs neuronaux, sans restriction de son potentiel de différenciation. En effet, l'intervention de facteurs inhibiteurs peut encore interrompre cette orientation.

(iii) L'étape d'engagement ou **DETERMINATION** ("commitment").

La cellule est cette fois engagée dans la voie neuronale. Elle est donc destinée à un devenir neuronal, et se désensibilise aux signaux inhibiteurs extérieurs

(iv) L'étape de **DIFFERENCIATION**

Le processus de maturation terminal se parachève. La cellule exprime les gènes caractéristiques d'une cellule nerveuse spécialisée.

Tout au long de ce parcours, ces cellules vont perdre progressivement leur caractère pluripotent et acquérir leur état différencié (Wilson et Edlund, 2001). Cette progression exige l'intégration de nombreux signaux ainsi qu'une cascade de facteurs de transcription spécifiques et représente une étape essentielle dans l'assemblage de circuits neuronaux

Une question fondamentale est de comprendre les processus par lesquels ces cellules, initialement homogènes, se différencient en une multitude de types cellulaires au moment approprié.

Un de nos axes de recherche au laboratoire s'intéresse aux mécanismes cellulaires et moléculaires de la seconde étape de spécification des lignages du SNC chez la souris. Nous nous intéressons plus particulièrement au devenir de progéniteurs neuraux qui expriment transitoirement le facteur de transcription NGN3/RELAX (Voir §Résultats 3).

Cette étape fait intervenir deux types particuliers de facteurs de transcription codés par les gènes proneuraux et neurogéniques. Dans une première partie, nous aborderons ces deux notions définies initialement chez la drosophile. Ces mécanismes apparaissent conservés au cours de l'évolution et mettent notamment en jeu certains des facteurs bHLH neuraux cités en première partie d'introduction. L'existence de fortes homologies entre ces bHLH ont permis d'isoler de nombreux homologues vertébrés de la drosophile par criblage hétérologue (**Tableau 6**). La seconde partie de ce chapitre 3 sera donc consacrée à description de l'évolution des fonctions proneurales et neurogéniques acquise chez les vertébrés (voir §3.2).

3.1 Spécification et détermination neurale chez *D. melanogaster*

Historiquement, le décryptage des mécanismes conduisant une cellule ectodermale à devenir un "précurseur neural", ou neuroblaste, puis une cellule nerveuse spécialisée a débuté chez la mouche du vinaigre (*Drosophila melanogaster*) ; grâce à l'étude de mutants (Campuzano *et al.*, 1985; Caudy *et al.*, 1988; Campos-Ortega, 1998) ; (Tableau 6 ; §3.2). En effet, l'apparente simplicité concernant le devenir des cellules issues du neuroectoderme en a fait un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires qui commandent le développement du système nerveux.

3.1.1 Singularité du développement du tissu neural chez la drosophile

La plus flagrante des particularités de ce modèle par rapport aux vertébrés est que cet insecte diptère holométabole effectue une métamorphose complète et passe par une alternance

d'états tantôt immobiles, tantôt actifs : œuf (immobile)/Larve (actif)/pré-imaginal (immobile) et imago (état actif).

Dans le système nerveux en formation, et contrairement à ce que l'on observe chez les vertébrés, la majorité des neurones est produite lors du développement post-embryonnaire, pendant la vie larvaire. Certaines phases de la neurogenèse se produisent également à des stades larvaires plus tardifs ou même chez l'adulte. La compréhension des mécanismes neurogéniques chez la drosophile implique nécessairement de découper les cascades d'événements en tenant compte du stade du cycle de vie auquel ils sont étudiés.

Une autre particularité du système nerveux des insectes est qu'il est entièrement situé ventralement et provient de la zone latéro-ventrale du blastoderme. La situation est différente chez les vertébrés, puisqu'il dérive du tube neural situé en position dorsale.

Chez la drosophile, le SNC est composé d'une entité centrale (système nerveux central ou SNC) composé de l'encéphale et du système nerveux central segmenté (SNCs). Ces tissus dérivent du neuroectoderme (ectoderme ventral). Dans la suite de ce paragraphe, nous considérerons uniquement la neurogenèse dans le SNCs, où la situation est la plus similaire à celle des études menées au laboratoire (tube neural postérieur des vertébrés). Le système nerveux est constituée par le système nerveux périphérique (SNP) émanant d'aires plus latérales appartenant à l'ectoderme. Le développement du SNP est essentiel, car il s'agit du système de perception sensorielle de l'insecte. Il est formé de quatre types différents d'organes : les organes sensoriels externes (es), les organes chordotonaux (cho), les neurones multidendritiques (md) et les photorécepteurs des yeux. Dès le stade larvaire, les organes sensoriels externes et internes ont une position fixe et sont facilement identifiables.

La conservation mécanistique est un premier argument justifiant la motivation des drosophilistes à utiliser ce modèle pour progresser sur l'étude de la neurogenèse. L'accès à une collection importante de mutants spontanés ou induits fut un atout et un outil majeur, donnant une réponse génétique immédiate à la perte ou le gain d'une fonction.

3.1.2 Définition des gènes proneuraux

La terminologie de gènes "proneuraux" est apparue au tout début des années 1990, pour traduire l'idée que ces gènes confèrent à un groupe de cellules ectodermales une propension à devenir neurales, sans que toutefois toutes les cellules de ce groupe deviennent des cellules du système nerveux (Ghysen et Dambly-Chaudière, 1990).

Les gènes proneuraux ont d'abord été définis comme responsables de l'acquisition de l'identité proneurale. Ils sont impliqués en amont de la décision du devenir des précurseurs des neuroblastes et/ou des épidermoblastes. Ils servent "d'aiguilleurs" à la cellule ectodermale qui les exprime en contrôlant l'engagement dans la voie neuronale. Leur fonction est de rendre une cellule multipotente de l'ectoderme, compétente à devenir une cellule nerveuse.

L'étude génétique du mécanisme de détermination neurale remonte à la deuxième décennie du vingtième siècle chez la drosophile, grâce à l'obtention de mutants dépourvus d'organes sensoriels externes *es*. Parmi ces phénotypes se cachent différents gènes tels que le complexe *achaete-scute* (AS-C) ou le gène *ato/atonal* (Villares et Cabrera, 1987) ; (Ghysen et Dambly-Chaudière, 1988) qui définissent deux familles de gènes "proneuraux". Actuellement, leur classification en temps que gènes proneuraux a été faite suite à l'analyse des mutants "perte/gain de fonction" [LOF-Lost Of Function et GOF-Gain Of Function] de ces gènes (Ghysen et Dambly-Chaudière, 1989, , 1990; Jimenez et Campos-Ortega, 1990; Jarman *et al.*, 1993).

3.1.2.1 Complexe *achaete-scute*

Chez la drosophile, le complexe de gènes *achaete-scute* (AS-C) se compose de plusieurs gènes dont *ac/achaete*, *sc/scute*, *l(1)sc/lethal of scute*, *ase/asense* (Campos-Ortega, 1998).

La comparaison de la séquence de ces quatre protéines a révélé d'une part une identité de 70% entre les quatre membres de ce complexe, et d'autre part des similitudes de séquence avec d'autres protéines bHLH déjà connues tel que l'oncogène MYC (Villares et Cabrera, 1987).

Ce complexe code des protéines bHLH ayant une fonction proneurale critique pour le développement du système nerveux chez la drosophile. L'étude des mutants perte et gain de fonction de ces gènes a permis de révéler que la spécificité de chacun de ces facteurs était hétérogène et différait selon le territoire dans lequel il s'exprime et selon le stade de développement observé (larvaire et adulte).

❖ AS-C et développement du SNC segmenté

L'expression des transcrits correspondant aux gènes *ac*, *sc*, *l(1)sc* est limitée au *primordium* du SNCs. Ces gènes s'expriment uniquement dans le neuroectoderme au sein des groupes de cellules qui sont appelées à générer les neuroblastes.

La délétion individuelle des gènes *achaete* ou *scute* n'induit pas de modification détectable dans le SNCs. En revanche, la délétion de *l(1)sc* provoque à elle seule la perte d'une fraction des

neuroblastes, ainsi que la dégénérescence cellulaire du SNC au cours du développement. Ce phénotype est aggravé par la délétion de la totalité du complexe AS-C, sans toutefois provoquer la disparition de la totalité des neuroblastes. Ces expériences de perte de fonction semblent indiquer une capacité de substitution de *l(I)sc* aux autres gènes et suggèrent un rôle majeur de *l(I)sc* dans la génération des neuroblastes (Jimenez et Campos-Ortega, 1990). Le dernier membre du complexe AS-C, *ase*, semble avoir chez l'adulte une fonction tardive uniquement au cours de la différenciation.

❖ AS-C et développement du SNP

Dans le SNP, la situation est spécifique de chaque organe sensoriel formé. Les premières études de mutants LOF ont montré que dans la larve de drosophile, les gènes *ac*, *sc* et *ase* sont nécessaires à la formation des organes **es** et de la majorité des neurones à dendrites multiples. Leur expression permet de définir tous les types cellulaires composant les organes sensoriels (neurones, cellules gliales, soies et cellules de soutien (Jimenez et Campos-Ortega, 1990).

L'étude des mutants *ac⁻* et *sc⁻* suggère une redondance de fonction entre ces deux gènes, dans la génération des progéniteurs des organes sensoriels (SOP) au niveau des **es**, chez l'embryon comme chez l'adulte. Ainsi, les cellules qui expriment *achaete* et *scute* participeront à la formation embryonnaire et adulte des organes **es** (mécano/chimio-sensoriels) (Rodriguez *et al.*, 1990).

Cependant chez l'adulte, il semble qu'il s'opère une réduction du champ d'action d'*achaete* et *scute*, qui se restreint à la formation des organes **es** uniquement (Jarman *et al.*, 1993).

La combinaison des résultats de LOF et des expériences d'expression ectopique suggère que les gènes proneuraux non seulement spécifient l'orientation des cellules ectodermes vers la voie neurale, mais semble aussi responsable de l'induction de l'identité des précurseurs formés, donc dans la détermination de ces cellules.

Le gène *ase* semble avoir un rôle proneural dans la formation des organes **es** de la larve. En revanche, chez l'adulte, son expression est postérieure à la formation des précurseurs neuraux. Il est induit par les gènes proneuraux du SNP pendant la différenciation neurale et son caractère proneural a été montré dans le choix des progéniteurs neuraux des disques imaginaux de l'aile (Dominguez et Campuzano, 1993) ; (Brand *et al.*, 1993).

❖ Bilan fonction AS-C

La mutation LOF du complexe AS-C a pour conséquence la perte de certains sous-types de progéniteurs neuraux distincts. Tandis que les mutations de chaque gène individuellement sont partiellement chevauchantes. Les produits de ces gènes ne confèrent pas les mêmes compétences aux précurseurs et interviennent dans des sous-lignages neuronaux distincts.

L'analyse par GOF a démontré que paradoxalement, tous les gènes AS-C ont la même activité intrinsèque. Quand ils sont exprimés ectopiquement, les quatre AS-C induisent le développement d'organes externes au dépend de l'épiderme (Rodriguez *et al.*, 1990); (Dominguez et Campuzano, 1993).

Cependant, les produits des gènes du complexe AS-C ne permettent pas de rendre compte de la totalité de la production des neuroblastes dans le SNCs. Qu'en est-il du rôle d'atonal et des autres membres de la famille ARP ?

3.1.2.2 Atonal et fonction proneurale

En se basant sur la forte conservation de la séquence protéique du motif bHLH, un autre gène proneural *ato/atonal* a été isolé par la méthode de RT-PCR dégénérée (Jarman *et al.*, 1993). Cette même propriété a permis l'isolement des premiers homologues vertébrés de ces gènes (Tableau 6 ; §3.2). Pourtant, *ato* ne présente que 46% d'identité avec *sc/scute* ce qui suggère son appartenance à une famille distincte de celle d'AS-C (Jarman *et al.*, 1993).

❖ *Ato* et développement du SNCs

Dans le SNCs, l'expression d'*ato/atonal* est limitée à une petite population de précurseurs embryonnaires déjà sélectionnés, ainsi qu'aux neurones chez la larve et l'adulte. La perte de fonction de *ato* dans le cerveau embryonnaire ne mène pas un phénotype proneural, mais provoque des défauts de branchement et de ramifications axonales, indiquant une fonction plus tardive d'atonal dans le SNCs que dans le SNP (Hassan *et al.*, 2000).

❖ *Ato* et développement du SNPs

L'étude d'atonal par GOF indique que l'expression ectopique d'*atonal*, dans le SNP adulte, conduit uniquement à la formation d'organes chordotonaux surnuméraires (Jarman *et al.*, 1993).

L'approche génétique par perte de fonction suggère qu'atonal est nécessaire à la détermination des progéniteurs neuraux impliqués dans la formation: (i) des organes chordotonaux

contenant, chez l'adulte, les propriocepteurs assurant la détection des vibrations sonores et mécaniques ; **(ii)** des photorécepteurs de la rétine ; **(iii)** d'un sous-ensemble d'organes olfactifs ; (iv) de certains neurones multidendritiques **md** (Jarman *et al.*, 1993); (Jarman *et al.*, 1994).

3.1.2.3 Autres bHLH neuronaux impliqués

Bien que les fonctions des gènes *asc* et *ato* semblent expliquer l'origine d'une grande partie des cellules constituant le SNP chez la drosophile, un nombre important de cellules neuronales se développe toujours chez le double mutant *asc/ato* (Jarman *et al.*, 1993). D'autres gènes candidats de la famille ARP ont été isolés et étudiés (Tableau 6 ; §3.2)

En 2000, deux nouveaux gènes ont été isolés chez la drosophile : *amos* (Absent Multidendritic neurons and Olfactory Sensillia) et *cato* (Cousin of ATonal) (Goulding *et al.*, 2000a; Goulding *et al.*, 2000b; Huang *et al.*, 2000b). Avec *atonal*, ils définissent une superfamille de gènes que l'on regroupe sous l'appellation ARP pour "atonal related proteins". Un gène additionnel, *tap/Target of Poxn* ou *bps/biparous*, a été isolé

Le produit du gène *cato* ne semble pas avoir de rôle proneural, puisqu'il participe à l'étape d'engagement neural après sélection des neuroblastes (Goulding *et al.*, 2000a).

Amos semble impliqué spécifiquement dans la fonction de détermination de la plupart des neurones **md**, ainsi que dans le "sensillia olfactif" dans le SNP adulte (Goulding *et al.*, 2000b).

Le gène *tap/bps*, membre de la famille des neurogénines, a fait l'objet de la recherche d'une capacité proneurale. Ce gène est exprimé particulièrement au niveau les organes chemosensoriels chez la larve et l'adulte, uniquement dans les neuroblastes avant différenciation des cellules neuronales et gliales matures, mais après l'engagement des progéniteurs neuraux. Il n'a donc aucune fonction proneurale chez la drosophile (Bush *et al.*, 1996; Gautier *et al.*, 1997; Ledent *et al.*, 1998).

3.1.2.4 Autres déterminants proneuraux

L'expression des différents gènes proneuraux que nous venons de présenter n'est pas suffisantes pour justifier la totalité de la fonction proneurale.

Récemment, le séquençage complexe du génome de *Drosophila melanogaster* a permis l'identification de nouveaux gènes inconnus, dont la séquence peptidique comporte un motif

bHLH putatif. Plusieurs d'entre eux sont exprimés dans le système nerveux, mais aucun ne semble posséder une fonction proneurale (Moore *et al.*, 2000; Ledent et Vervoort, 2001; Peyrefitte *et al.*, 2001).

D'autres gènes sont probablement impliqués dans cette étape de détermination nerveuse et restent à identifier (Bertrand *et al.*, 2002).

Enfin, d'autres gènes comme par exemple *da/daughterless*, code un bHLH ubiquitaire de classe I (Murre *et al.*, 1989) ; (Vaessin *et al.*, 1990), se trouve impliqué par exemple dans le déterminisme du sexe. Ces données peuvent-elles être appliquées à la fonction de détermination neurale? La protéine daughterless participe à la formation de tous les organes sensoriels chez la larve et chez l'adulte. Grâce à ses propriétés d'hétérodimérisation, il se lie avec des bHLH, comme par exemple celle du complexe AC-S, dont les territoires d'expression sont restreints et permet ainsi de réguler la transcription de gènes cibles, responsables du développement des précurseurs nerveux. Il semble toutefois que sa fonction se limite plutôt au maintien des processus d'engagement.

Ainsi, d'autres catégories de gènes, différents de la famille de bHLH, possèdent une activité proneurale comme par exemple *vnd/Ventral Nervous system condensation Defective* qui code une protéine à homéodomaine. L'étude génétique de *vnd*, semble indiquer que cette protéine possède les propriétés d'un facteur proneural. En effet, l'analyse de la mutation LOF *vnd* met en évidence une hypoplasie neurale de 20 à 25% par rapport au sauvage. L'effet de cette mutation est accentué chez le double-mutant *vnd* /AC-S⁻, dans lequel 50% des neuroblastes sont absents. De plus, la surexpression de la protéine homeobox *vnd* conduit au développement préférentiel de neuroblastes au détriment des épidermoblastes.

3.1.2.5 Gènes proneuraux : Points communs et remarques générales

L'analyse des mutants LOF et GOF de la drosophile et l'étude de la fonction des gènes proneuraux, a permis de dégager plusieurs caractéristiques communes pré-requises les définissant comme proneurales.

- ❖ Un gène proneural est nécessairement exprimé dans l'ectoderme ou le neuroectoderme, avant tout signe de différenciation neuronale.

- ❖ Le produit d'un gène proneural est nécessaire et suffisant pour favoriser la génération de progéniteurs neuronaux à partir de l'ectoderme. Par surexpression (GOF), il induit une hyperplasie neurale.

L'expression cellulaire restreinte particulière de chacun de ces gènes implique qu'ils sont responsables de la mise en place dans le temps de différents lignages neuronaux distincts. En effet, l'exemple des produits du complexe AS-C et du gène *ato*, employés dans les différents territoires neuronaux ne confèrent pas les mêmes compétences aux précurseurs par exemple des différents organes sensoriels dans le SNP.

Ainsi, les gènes proneuraux semblent jouer un rôle critique, non seulement dans le choix du destin neural mais également dans le choix des sous-types neuronaux. Ils participent aussi au maintien de l'engagement dans une voie nerveuse, ainsi qu'à la différenciation des précurseurs nerveux. La fonction des gènes proneuraux n'est donc pas limitée à l'orientation d'un précurseur vers une voie neuronale générique. Ces gènes sont également impliqués dans la détermination d'un sous-type neuronal particulier.

3.1.3 Définition des gènes neurogéniques

La terminologie "neurogénique" est antérieure à la notion proneurale (Campos-Ortega, 1988). Elle découle de l'étude génétique de mutants LOF présentant un excès de cellules nerveuses formées aux dépens du tissu hypodermique ventral et céphalique (Poulson, 1937; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1983; Hoppe et Greenspan, 1986; Hartenstein et Posakony, 1989). Toutes les mutations des gènes neurogéniques sont létales mais peuvent cependant être étudiées chez l'adulte en faisant des recombinaisons somatiques.

Ces gènes neurogéniques sont impliqués dans le choix du progéniteur, à l'intérieur d'un groupe de cellules proneurales, qui va se maintenir dans la voie de différenciation neurale. Ces étapes sont consécutives à l'expression des gènes proneuraux, qui interviennent dans la régulation de *loci* neurogéniques particuliers. La résultante est : (i) une activation des gènes pan-neuraux ou neurogéniques dans les neuroblastes, orientant ceux-ci vers la voie de différenciation neurale "générale" ; (ii) l'inhibition de l'expression de ces mêmes gènes dans les cellules épidermales adjacentes. Ce dernier processus porte le nom d'inhibition latérale, que nous aborderons après avoir présenté les acteurs neurogéniques.

Ainsi, comme leur nom ne le laissait pas présumer, les gènes neurogéniques interviennent pour restreindre le nombre de neuroblastes formés et non pour promouvoir la neurogenèse.

C'est à dire qu'en l'absence d'une expression régulée de ces gènes, toutes les cellules du groupe proneural initial deviendraient des neuroblastes.

Chez la drosophile, un grand nombre d'analyses génétiques a permis d'identifier une dizaine de gènes neurogéniques : **amx**/almondex, **bib**/big brain, **DL**/Delta, le complexe Enhancer of split [E(spl)-C], **gro**/groucho (Muhr *et al.*, 2001) ; **mam**/mastermind, **neu**/neuralized, **N**/Notch, **Psn**/preseniline (Boulianne *et al.*, 1997), et **Su(H)**/suppressor of Hairless.

Ces études ont montré que ces différents loci forment une chaîne fonctionnelle de relations épistatiques, pour leur participation à la ségrégation des neuroblastes par rapport aux épidermoblastes. Les différents produits de ces gènes sont aujourd'hui connus et leur analyse moléculaire a permis d'intégrer certaines de ces protéines dans une cascade de signalisations intercellulaires conduisant à "l'inhibition latérale" (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

3.1.4 Inhibition latérale

L'expression des gènes impliqués dans l'étape de détermination neuronale est directement contrôlée par un système de communication juxtacrine, c'est à dire entre cellules adjacentes, appelé inhibition latérale ou voie de signalisation Notch. Cette dernière molécule a été nommée "Notch" en hommage à la première description de mutant Notch (tradition chez les drosophilistes). Il s'agit d'un mutant partiel (haplo-insuffisant), qui présente des entailles ("notches" en anglais) dans la bordure de l'aile chez l'adulte (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995). Dans la région ventrale de l'embryon de la mouche, l'ectoderme ventral et latéral produit des cellules nerveuses et de l'épiderme.

Les gènes proneuraux sont tout d'abord exprimés d'une manière équivalente dans des groupes de cellules appelés faisceaux proneuraux (proneural clusters), à l'intérieur desquels toutes les cellules sont équivalentes. Malgré leur propension à devenir un progéniteur neural, elles ont encore le choix dichotomique entre neuroblastes ou épidermoblastes (spécification). La décision d'un devenir neuronal au sein de la zone neurogénique est régulée par l'interaction cellule-cellule entre un ligand Delta délivrant un message d'inhibition et son récepteur appelé Notch, qui reçoit le signal d'inhibition. Ces deux protagonistes sont initialement produits en proportions stœchiométriques formant un équilibre dans toutes les cellules du faisceau.

Cependant cet équilibre instable est rapidement rompu, et progressivement la cellule centrale (futur progéniteur neuronal) commence à produire plus de Delta que ses voisines adjacentes. Les causes de ce déséquilibre sont complexes et semblent faire intervenir la combinaison

d'actions stochastiques, d'hétérogénéité d'adressage de certains facteurs (séquestration) ou encore sont induites par la division asymétrique de ces cellules et/ou des signaux extrinsèques, tels que la voie de signalisation à l'EGF (zur Lage *et al.*, 2004).

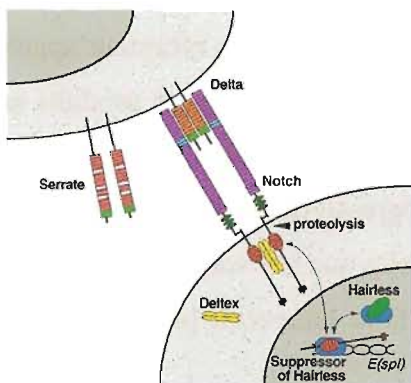
La sur-activation directe de Delta est l'étape clef du processus d'inhibition latérale. Elle dépend du niveau d'expression des gènes proneuraux et se manifeste par une légère augmentation de l'activité proneurale de cette cellule.

La cascade de signalisation de la voie Notch est alors activée par la présence de Delta à la surface de la cellule centrale. Le message d'inhibition est communiqué aux 4 à 6 cellules environnant la cellule émettrice du signal par l'activation de leur récepteur transmembranaire Notch et par l'induction dans ces cellules avoisinantes de régulateurs négatifs de la neurogenèse. Les conséquences immédiates sont **(i)** la répression de la synthèse de Delta dans les cellules périphériques; **(ii)** l'inhibition de l'expression des gènes proneuraux par ces mêmes cellules; **(iii)** la restriction de l'expression des gènes proneuraux à la cellule centrale, déterminant ainsi le futur précurseur neuronal (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

La cellule centrale exprimant plus de Delta est entourée d'autres cellules exprimant moins de Delta (périphérie), mais dans lesquelles la signalisation Notch est active. Une cellule qui produit un signal d'inhibition ne recevra pas en retour de signal inhibition.

Cette asymétrie permet la transformation d'un patron d'expression proneural, appliqué à un groupe de cellules épithéliales (faisceau proneural), en un progéniteur individuel. Cette étape se répète et permet la formation par vagues des neuroblastes pendant toute la période de la neurogenèse (Bertrand *et al.*, 2002).

Lorsque le ligand Delta se fixe sur le récepteur Notch, la première étape de la transduction du signal au noyau est le clivage du récepteur transmembranaire lui-même. Un complexe contenant la Préséniline clive le domaine C-terminal intracellulaire de Notch. Ce domaine nommé NotchIC, désolidarisé de la membrane, est transporté dans le noyau (De Strooper *et al.*, 1999) ; (Struhl et Greenwald, 1999).



La figure ci-contre représente un "agrandissement moléculaire" du mécanisme de signalisation entre Delta et Notch : le but de cette voie de transduction est de conduire à la modification de l'expression des gènes responsables de la différenciation neurale dans une seule cellule au détriment de celles qui l'entourent.

Les facteurs de transcription Su(H) et mastermind se lient au domaine intracellulaire de Notch pour contrôler l'expression des gènes formant le complexe E-(Spl) (enhancer of split) (Bailey et Posakony, 1995; Lecourtois et Schweisguth, 1995; Wu *et al.*, 2000). Ce complexe code 7 protéines de la famille bHLH, qui sont des répresseurs de la transcription, associées en partenariat avec la protéine co-répresseur groucho pour inhiber l'expression des gènes proneuraux (Heitzler *et al.*, 1996; Fisher et Caudy, 1998). L'inhibition de l'activité proneurale est contrôlée par la fixation directe du complexe répresseur d'E(spl)/groucho sur les séquences régulatrices des gènes proneuraux (le motif d'ADN identifié s'appelle N-Boîte, CACNAG), mais aussi par la compétition pour le recrutement des facteurs non ubiquitaires de classe I Da (Van Doren *et al.*, 1994; Kageyama et Nakanishi, 1997; Jensen *et al.*, 2000b; Davis et Turner, 2001; Giagtzoglou *et al.*, 2003).

En résumé, au sein de la zone neurogénique, certaines cellules décident d'activer leur programme neurogénique, tout en réprimant celui des cellules voisines. Le processus de l'inhibition latérale permet donc de sélectionner les progéniteurs neuraux parmi une population apparemment homogène, et rompt l'état d'équilibre original du foyer de cellules proneurales. Ainsi le patron d'expression des gènes proneuraux se limite à la cellule désignée pour participer à la voie de différenciation neurale. Les facteurs de transcription cibles de la voie de signalisation Notch, notamment Achaete-scute, agissent comme commutateurs de la différenciation neuronale finale.

3.1.5 Bilan

Les protéines bHLH neuronales de classe II participent à la destinée nerveuse dans l'ectoderme, en agissant **(i)** soit comme des régulateurs positifs associés à des protéines ubiquitaires de classe I, telles que la protéine **da**/daughterless ; **(ii)** soit en régulateurs négatifs par formation d'hétérodimères antagonistes avec le produit de gènes **h**/*hairy* ou le complexe E(spl)-C (HLH de classes VI). L'ensemble de ces gènes jouent un rôle important au cours du développement. Une anomalie d'expression de n'importe lequel d'entre eux a comme conséquence une hyper-/hypo- plasie du système nerveux. Des expériences de perte / gain de fonction ont permis de démontrer que certains de ces gènes sont nécessaires et suffisants pour favoriser la génération de progéniteurs neuronaux dans l'ectoderme. Les produits de ces gènes participent à l'établissement des différents lignages neuronaux et ne confèrent pas les mêmes compétences aux précurseurs qui les expriment. Par exemple, AS-C et **ato** participent à la formation

d'organes sensoriels distincts qui constituent le système nerveux périphérique de la drosophile. AS-C est essentiel pour la formation des organes sensoriels externes (**es**) (Villares et Cabrera, 1987; Ghysen et Dambly-Chaudiere, 1988; Jimenez et Campos-Ortega, 1990) ; tandis que *atonal* est exigé pour la formation des organes sensoriels internes Chordotonaux (**cho**), des photorécepteurs de l'œil et de quelques neurones multidentritiques (Gupta et Rodrigues, 1997; Hassan *et al.*, 2000).

Les gènes bHLH peuvent être divisés en deux classes qui se distinguent par leur fonction:

(i) Les gènes proneuraux, comme *atonal* ou le complexe AS-C, sont exprimés en amont d'un quelconque signe de différenciation neurale et sont indispensables au choix des progéniteurs neuronaux dans les territoires neurogéniques.

Le rôle des gènes proneuraux étant de conférer à un groupe de cellules ectodermales une prédisposition à devenir neurales, la perte de fonction des gènes proneuraux engendre une hypoplasie du SNCs et/ou du SNP. Cette hypoplasie est due à la diminution du nombre de cellules capable de s'engager dans la voie neuronale.

(ii) Les gènes neurogéniques, tels que *cato* et *biparous*, sont exprimés au cours de la différenciation neurale, soit en aval de la sélection des progéniteurs.

Ainsi ces deux groupes complémentaires pour la formation du lignage neuronal présentent, lorsqu'ils sont mutés, des phénotypes opposés.

Les gènes proneuraux poussent les cellules ectodermales vers une destinée neuronale, tandis que l'inhibition latérale permet de maintenir au sein du territoire neurogénique un réservoir de progéniteurs qui peuvent continuer à proliférer et donner, à un stade ultérieur, d'autres types cellulaires.

Les étapes de détermination au cours de la neurogenèse dépendent de boucles de rétrocontrôle entre gènes proneuraux et gènes neurogéniques (Van Doren *et al.*, 1994; Heitzler *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter que le mécanisme d'inhibition latérale ne se limite pas à la différenciation neurogénique dans le SNCs de la drosophile. Il semble qu'un nombre croissant de phénomènes biologiques soit régulé par la voie de signalisation Notch. Un point commun les regroupe : ils concernent tous une phase de détermination d'une cellule individualisée, présente au sein de groupes de cellules équipotentes (situations fréquemment rencontrées au cours du développement). Par exemple le même mécanisme est utilisé dans le reste du tissu nerveux (SNP et organes sensitifs), lors de la formation des cellules germinales primordiales

au cours de l'oogenèse, ou bien dans l'identité d'annexes segmentées, telles que les membres, les antennes, ou les ailes (Portin, 2002).

D'un point de vu taxonomique, l'emploi de ce mode de communication juxtacrine se trouve relativement conservé au cours de l'évolution, des nématodes aux vertébrés, sans oublier les arthropodes. Deux exemples dans lesquels la voie Notch intervient chez les vertébrés seront détaillés : le premier au cours de la neurogénèse chez les vertébrés (§3.2) et le second au cours de l'engagement des cellules progénitrices/souches du pancréas dans la voie endocrine (§4).

<i>Stratégie d'isolement</i>	<i>Propriétés utilisées/ clonage</i>	Gènes	Groupes	classes	<i>références</i>
Mutants		<i>AS-C da</i>	AS-C	II I	(Campuzano <i>et al.</i> , 1985; Caudy <i>et al.</i> , 1988; Campos-Ortega, 1998)
PCR dégénérée	Homologie de séquences	<i>Ato</i> <i>Amos</i> <i>Cato</i> <i>Biparous</i>	ARP ngn	II II	(Jarman <i>et al.</i> , 1993; Bush <i>et al.</i> , 1996; Goulding <i>et al.</i> , 2000a; Goulding <i>et al.</i> , 2000b; Huang <i>et al.</i> , 2000)
PCR dégénérée	orthologue	<i>Mash-1&2 rat</i> <i>Math1</i> <i>Math2/Nex1</i> <i>Beta3</i> <i>Math4C, A, B</i> <i>NeuroD2/KW8/N</i> <i>DRF</i>	AS-C ARP Ngn NeuroD	II II II II	(Bartholoma <i>et Nave</i> , 1994; Akazawa <i>et al.</i> , 1995; Shimizu <i>et al.</i> , 1995; Kume <i>et al.</i> , 1996; Ma <i>et al.</i> , 1996; Peyton <i>et al.</i> , 1996; Sommer <i>et al.</i> , 1996; Yasunami <i>et al.</i> , 1996; Cau <i>et al.</i> , 1997)
		<i>EPAS1;</i> <i>BMAL1/2; NXF;</i> <i>Npas3; Nhlh2</i>	bHLH-PAS	VII	(Brown <i>et al.</i> , 1992; Shimizu <i>et al.</i> , 1995; Brunskill <i>et al.</i> , 1999; Favier <i>et al.</i> , 1999; Okano <i>et al.</i> , 2001; Ooe <i>et al.</i> , 2004)
Criblage sonde rat	orthologue	<i>Mash1 souris,</i> <i>Xash-1, HASH1</i>	AS-C	II	(Ball <i>et al.</i> , 1993; Ferreira <i>et al.</i> , 1993; Guillemot <i>et Joyner</i> , 1993)
PCR dégénérée Tissu-spécifique	Homologie de séquences	<i>Relax</i>	ngn	II	(Ravassard <i>et al.</i> , 1997a; Ravassard <i>et al.</i> , 1997b)
Criblage <i>in silico</i>	Détection motif bHLH	<i>Math5&6,</i> <i>hash 2,</i> <i>Cash 4,</i> <i>atoh 7</i>	ARP	II	(Inoue <i>et al.</i> , 2001; Ledent <i>et Vervoort</i> , 2001; Peyrefitte <i>et al.</i> , 2001; Jonsson <i>et al.</i> , 2004) (Brown <i>et al.</i> , 2002; Yokomine <i>et al.</i> , 2005)
Y2H	Dimérisation domaines HLH	<i>NeuroD souris;</i> <i>Math4A/B/C</i> <i>p60TRP;</i> <i>eHAND</i>	NeuroD ngn	II II	(Cserjesi <i>et al.</i> , 1995; Lee <i>et al.</i> , 1995; Gradwohl <i>et al.</i> , 1996; Yoshida <i>et al.</i> , 2001; Heese <i>et al.</i> , 2004)
Criblage de banque génomique	site de liaison à l'ADN	<i>rITF2</i> <i>Olig1</i>	Da Olig	I II	(Yoon <i>et Chikaraishi</i> , 1994; Takebayashi <i>et al.</i> , 2000)
Y1 _{+1/2} H	Dimérisation et site de liaison à l'ADN	<i>Beta2</i>	NeuroD	II	(Naya <i>et al.</i> , 1995)
Y1H	site de liaison à l'ADN	<i>Olf1; mist 1;</i> <i>rITF2/E2-2</i> <i>Zenon*</i>	COE Da POZ	I Non bHLH	(Chong <i>et al.</i> , 1995; Lemercier <i>et al.</i> , 1997; Kiefer <i>et al.</i> , 2005)

* Par cette approche d'autres facteurs de transcription non bHLH ont été obtenus comme par exemple le facteur ZENON (Zing finger gene Expressed in NeurON)

Tableau 6 Stratégies d'isolement de bHLH proneuraux

3.2 Neurogenèse chez les Vertébrés

En partant du principe que les événements que nous venons de décrire chez la drosophile sont potentiellement transposables à la neurogenèse des mammifères, il est possible de rechercher les déterminants génétiques contrôlant la neurogenèse chez les vertébrés par homologie de séquence avec ceux identifiés chez la drosophile. Fort des caractéristiques communes des bHLH identifiés chez la drosophile, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin d'isoler: (i) de nouveaux bHLH neuronaux; ainsi que (ii) les homologues des gènes de la drosophile impliqués dans la neurogenèse chez les vertébrés. Cette recherche s'est effectuée par des approches totalement différentes: soit par homologies de séquences ou basées sur les propriétés intrinsèques des bHLH. Le **Tableau 6** résume ces différentes stratégies de recherche:

- ❖ Des bHLH homologues entre drosophile et vertébré par homologie de séquences (PCR dégénérées). Les autres orthologues étant identifiés le plus souvent par PCR où criblages hétérologues, ou par prospection dans les groupes de liaison conservés entre les génomes de différentes espèces (synténiques).
- ❖ Des facteurs de transcription possédant un motif bHLH conservé dans un tissu donné (PCR dégénérées).
- ❖ Des facteurs putatifs non isolé expérimentalement mais identifiés par criblage systématique de séquences génomiques complètes (*in silico*).
- ❖ Facteurs capables de se fixer sur une boîte E caractérisée et localisée dans une séquence promotrice particulière par criblage de banque d'expression; test fonctionnel "*in Saccharomyces*" (technique du simple hybride nommée Y1H dans le Tableau 6) (Wang et Reed, 1993).
- ❖ Facteurs hétérodimériques capables de fixer des bHLH connus comme par exemple des bHLH ubiquitaires de classes I (E12/E47) (technique du double-hybride nommée Y2H dans le Tableau 6) (Fields et Song, 1989; Chien *et al.*, 1991; Fields et Sternglanz, 1994).
- ❖ Facteurs possédant la capacité de former des hétérodimères et celle de lier une boîte E spécifiquement présente dans une séquence promotrice d'un gène. La technique employée est une variante de la technique du simple-hybride (appelée "simple hybride

et demi" ou $Y1_{+1/2}H$ dans le Tableau 6) et permet d'identifier les facteurs dont la dimérisation est un pré-requis nécessaire à la fixation sur sa séquence d'ADN cible.

La **Figure 12** représente une carte actuelle des bHLH neuronaux (Bertrand *et al.*, 2002). Chaque embranchement représente le regroupement en sous-famille sur des critères d'homologie de séquences du domaine bHLH. Il est de plus évident que pour la classification des bHLH, les aspects fonctionnels sont à prendre en considération.

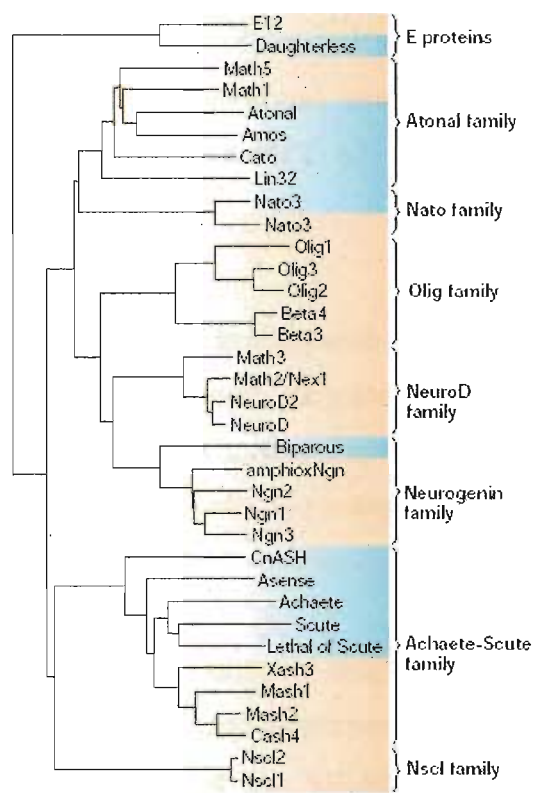


Figure 12 Représentation des bHLH neuronaux (Bertrand *et al.* 2002)

Dendrogramme obtenu à partir de l'alignement des domaines bHLH de 35 membres représentatifs des bHLH. Sont indiqués en **rouge**, les membres isolés chez les vertébrés et en **bleu** ceux des invertébrés. Seuls les deux premiers membres E12 et daughterless appartiennent à la classe I définie par Massari *et al.* (2000) et sont utilisés dans cet arbre comme groupe de référence extérieur. Les autres bHLH neuronaux se trouvent regroupés dans la classe II.

3.2.1 bHLH de vertébrés et fonction proneurale

L'étude du modèle drosophile a permis d'établir une définition générique des fonctions proneurales et neurogéniques. En se plaçant dans une logique de conservation fonctionnelle au cours de l'évolution, il est intéressant d'évaluer pour les candidats vertébrés si les "critères drosophiliens" s'y appliquent. Les homologues des gènes bHLH neuronaux de la drosophile chez les vertébrés comportent une forte identité de leurs séquences en acides aminés avec les protéines produites par les gènes du complexe AS-C ou des ARP (**Tableau 7**). Par leurs homologies de séquences, ils peuvent prétendre à une fonction proneurale.

Gènes proneuraux		Homologues proneuraux?
		
Complexe Ac-s(c)	→	Mash1; Mash2
atonal	→	Math1; Math5 (orthologue)
delilah, G11450	←	NeuroD1; 2; Math2/nex1; Math3 NeuroM
Biparous; target of poxn/TAP		Neurogénines 1, 2 & 3
Ventral Nervous system condensation Defective (vnd)		
Daughterless (Dl)	Hétérodimères associés	E2A, HEB, E2-2, E47

Tableau 7 Correspondance entre facteurs proneuraux drosophiliens et vertébrés

En orange sont indiqués les facteurs décrits comme étant proneuraux. Les flèches vertes indiquent la chronologie d'obtention des homologues.

Leurs fonctions précises ont été abordées par gain/perte de fonction (GOF et LOF respectivement). Les expériences de surexpression/GOF chez les vertébrés sont le plus souvent réalisées par micro-injection chez l'embryon de xénope, par des électroporations *in ovo* ou enfin par transgénèse classique chez la souris. L'obtention de mutants LOF a été obtenue par invalidation génique (recombinaison homologue) chez la souris.

Sur la base de la fonction proneurale définie chez la drosophile, un facteur bHLH proneural de vertébré répondra à plusieurs critères caractéristiques : (i) chez l'embryon son expression devrait être restreinte pendant la période de production des neurones ; (ii) les expériences de GOF produisent une hyperplasie neurale ; (iii) les expériences de LOF produisent une hypoplasie neurale ; (iv) l'activité de ce facteur est régulée par la voie de signalisation Notch. Ces approches ont permis de définir pour certains bHLH une fonction claire dans l'étape de détermination neurale ou, de façon plus large, une participation aux mécanismes impliqués dans la différenciation nerveuse.

3.2.1.1 Homologues du complexe AC-S

Les premiers homologues des gènes du complexe *AC-S* isolés chez les vertébrés sont les gènes *Mash 1* et *2* (mammalian achaete-scute homolog) (Johnson *et al.*, 1990). Ils ont été obtenus par "RT-PCR dégénérée", réalisée à partir d'ARN extrait d'une lignée cellulaire de progéniteurs sympatho-adrénergiques de rat (Birren *et al.*, 1992). Les deux protéines MASH1 et 2 partagent 39% et 86% d'identité sur la totalité de leurs séquences et sur leurs domaines bHLH, respectivement.

❖ *Mash1*

Le criblage hétérologue à faible stringence (sonde *mash1* de rat) de banques d'ADNc issues d'embryons de différentes espèces, a permis d'isoler les orthologues de *Mash1*, qui ont été désignés: *Mash1*_[mouse] chez la souris (mouse AS-C homologue 1) (Guillemot et Joyner, 1993), *Xash1*_[xenopus], chez le xénope (Ferreiro *et al.*, 1993), *Cash1*_[chicken], chez le poulet (Jasoni *et al.*, 1994), *HASH1*_[Human], chez l'homme (Ball *et al.*, 1993). Ils possèdent respectivement 97%, 78%, 88% et 95% d'identité par rapport à la séquence de rat (alignements effectués à l'aide ClustalW). Puis plus tardivement, l'homologue chez le poisson zèbre *Zash1*_[zebrafish] a été isolé (WashU Zebrafish EST Project, 1998).

MASH1 est un régulateur positif de la neurogenèse, capable de former un complexe hétérodimérique avec E2A, un homologue de daughterless (Johnson *et al.*, 1990; Guillemot et Joyner, 1993).

L'expression transitoire de MASH1 est restreinte au système nerveux, en aval de l'induction neurale (E8.5 pour les premiers ARNm détectés) et disparaît définitivement avec l'apparition

de certains marqueurs de différenciation neuronaux. Fait important, les territoires d'expression de ce gène se trouvent situés dans les zones de prolifération cellulaire (zone ventriculaire).

Initialement, les ARNm *Mash1* sont décelés dans des territoires discrets de la zone ventriculaire du SNC (télencéphale ventral, territoire présomptif du futur *locus coeruleus* ainsi que certaines régions de la moelle épinière) et s'étendent un peu plus tardivement bien au-delà de cette zone et ce jusqu'après la naissance. Ce facteur se trouve également exprimé dans l'épithélium olfactif, la neurorétine et dans le système nerveux périphérique (SNP) au niveau des progéniteurs autonomes qui donneront naissance aux ganglions entériques, sympathiques et parasympathiques (Johnson *et al.*, 1990; Guillemot et Joyner, 1993; Guillemot *et al.*, 1993; Guillemot, 2000).

La surexpression du gène *Mash1* dans une lignée cellulaire établie à partir d'un carcinome embryonnaire (P19) induit une différenciation neuronale dans des conditions de cultures permissives en présence d'acide rétinoïque (Johnson *et al.*, 1992; Farah *et al.*, 2000).

L'invalidation constitutive du locus *Mash1* entraîne une létalité périnatale. Dans l'épithélium olfactif des embryons *Mash1*^{-/-}, les cellules progéniteurs meurent précocement sans que cela n'altère les cellules de soutien non neuronales avoisinantes. Chez les souris *Mash1*^{-/-}, le tube neural de ces mutants est normal en apparence tandis que l'épithélium olfactif, les ganglions du système autonome et entérique sont sévèrement affectés. Chez les embryons mutants, les progéniteurs catécholaminergiques, puis les neurones entériques sérotoninergiques qui en découlent, sont absents. La mutation nulle de *Mash1* touche spécifiquement les neurones entériques issus d'une population de précurseurs qui expriment la tyrosine hydroxylase (Blaugrund *et al.*, 1996). De plus, il semble que dans le système autonome, MASH1 intervienne au cours de la différenciation terminale des neurones noradrénergiques (Sommer *et al.*, 1995).

Dans le télencéphale, la zone subventriculaire (ZSV) de l'éminence ganglionnaire médiale est particulièrement affectée par la mutation nulle ainsi que certaines sous-populations cellulaires des ganglions de la base et du cortex cérébral. Cette diminution du nombre de cellules neuronales semble être la conséquence d'un défaut de différenciation des progéniteurs neuronaux. Ces observations sont associées à une altération de la voie de signalisation Notch où l'absence d'expression des ligands delta 1 et 3 et de l'effecteur Hes 5 est observée. Dans l'éminence ganglionnaire latérale, l'absence de voie de signalisation Notch se traduit par une expression prématurée de marqueurs de la ZSV par les cellules situées dans la zone

ventriculaire (Casarosa *et al.*, 1999). Au vu de cette étude, MASH1 apparaît clairement être un régulateur de la neurogenèse dans le télencéphale ventral. Il intervient plus particulièrement dans l'étape de spécification mais aussi dans le contrôle de la cinétique de production des précurseurs neuronaux.

En résumé les domaines d'expression de MASH1 sont vastes. L'ensemble des données que nous venons de lister suggèrent que le produit du gène *mash1* possède au moins deux fonctions l'une proneurale en tant que régulateur positif de la neurogenèse (placodes olfactives et télencéphale ventral) ; l'autre plus tardive de différenciation neuronale (système nerveux autonome).

❖ *Mash 2*

Ce second homologue a initialement été isolé à partir d'une lignée dérivée de la crête neurale de rat (Johnson *et al.*, 1990), possède un homologue chez la souris (Guillemot et Joyner, 1993). Il est localisé dans une région génomique soumise à l'empreinte génétique (Guillemot, 2000). Cette dernière particularité a permis de localiser certains des homologues de *Mash 2* dans d'autres espèces. En effet, dans le génome humain, le locus *hash2* est compris dans une région du chromosome 11 décrite comme soumise à l'empreinte et comportant une synténie avec la région distale du chromosome 7 de la souris (Miyamoto *et al.*, 1996) ; (Alders *et al.*, 1997).

Mash 2 n'a pas révélé à ce jour de distribution dans le SNC. Récemment, son expression dans le SNP a été détectée *in vitro*, dans les cellules de Schwann du nerf sciatique de l'adulte (Kury *et al.*, 2002). Cependant, l'analyse du patron d'expression de ce gène ainsi que l'étude des mutants perte de fonction *Mash 2* suggèrent son implication dans le développement du lignage trophoblastique indispensable à la mise en place du placenta (Guillemot *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1997; Rossant *et al.*, 1998; Guillemot, 2000; Cross *et al.*, 2003).

D'autres homologues du complexe AS-C tels que *Xash3* *aetb* ou *cash4* possèdent des caractéristiques fonctionnelles similaires permettant de proposer une fonction analogue à celle des gènes proneuraux de drosophile (Zimmerman *et al.*, 1993; Turner et Weintraub, 1994).

3.2.1.2 Homologues d'atonal

Parmi les six groupes de bHLH initialement répertoriés comme homologues d'atonal, seuls Math1 et Math5 sont considérés comme véritables orthologues.

Dans des modèles de gain de fonction chez le xénope ou *in ovo* chez le poulet, les facteurs Xath1, Xath5 (homologues anoures d'atonal) et Cash5 (poulet), sont capables d'induire une différenciation neurale (Kanekar *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997; Takebayashi *et al.*, 1997; Matter-Sadzinski *et al.*, 2001).

La perte de fonction Math1 chez la souris a permis de déterminer qu'il était nécessaire dans le SNC à la génération des neurones granulaires du cervelet, et dans le développement de l'épithélium sensoriel de l'oreille interne (Ben-Arie *et al.*, 1997; Woods *et al.*, 2004). Dans la moelle épinière, l'absence de Math1 entraîne une perte de la population des interneurons D1 au profit de la population adjacente (cellules du toit). À l'inverse, son expression ectopique induit entre autre la formation d'interneurones D1 au détriment des populations environnantes. Math1 semble donc cumuler deux fonctions : l'une au cours de la spécification de l'identité des lignages neuronaux (Bermingham *et al.*, 2001; Gowan *et al.*, 2001), l'autre correspondant à une activité proneurale proche de celle d'atonal (Bermingham *et al.*, 1999; Ben-Arie *et al.*, 2000). De plus, en termes de fonction, atonal et math1 semblent interchangeable. En effet, chez la souris déficiente en Math1, le produit de l'expression du gène *ato* permet de compenser l'absence de Math1. Inversement, Math1 peut assumer la fonction proneurale de *ato* et induire la formation ectopique d'organes chordotonaux chez la drosophile (Ben-Arie *et al.*, 2000).

Il manque des preuves directes concernant la fonction proneurale de Math5. Toutefois, ce gène est essentiel à la production des cellules ganglionnaires rétiniennes (Wang *et al.*, 2001). Les mutations LOF de Math5 et Zath5 ont pour conséquence un déséquilibre de la balance entre cellules ganglionnaires de la rétine et les autres types cellulaires.

3.2.1.3 Neurogénines

Biparous et les différents neurogénines font partie de la même famille d'orthologues. Chez la drosophile, les fonctions de biparous sont strictement impliquées après la spécification des progéniteurs nerveux. Il était intéressant de déterminer si les neurogénines ont conservé la

fonction de biparous ou ont acquis au cours de l'évolution d'autres capacités liées aux étapes de spécification et de détermination neuronale.

Afin de statuer sur ce point, les premières expériences de surexpression ont été effectuées chez le xénope. La surexpression de *Xngn1* ou de *Relax* entraîne au niveau de la plaque neurale une différenciation neurale ectopique et précoce (Ghysen *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1996; Ravassard *et al.*, 1997d). De façon similaire aux gènes proneuraux de drosophile, *XNgn1* induit l'activation de l'expression de *Delta*, et en réponse celle de la voie de signalisation Notch.

Chez la souris, de nombreuses études menées sur les trois gènes *Ngns* sont basées essentiellement sur l'étude des mutants LOF de ces différents gènes. Il en ressort que dans le SNC, *ngn1* et *ngn2* sont essentiels dans la détermination du lignage sensoriel crânien (Fode *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1998). En effet, en absence de *Ngn1* ou *Ngn2*, des groupes complémentaires de ganglions sensoriels crâniens sont déficients par défaut de détermination neuronale. Chez les doubles mutants *ngn1* et *ngn2*, l'ensemble des ganglions sensoriels crâniens est absent. Il en est de même au niveau des racines des ganglions dorsaux et de la moelle épinière où la perte de fonction des *Ngns* conduit à une privation de neurones sensoriels et de la plupart des neurones ventraux respectivement. Il a été démontré que l'absence de lignage neuronal dans ces trois territoires est la conséquence de la perte de progéniteurs neuronaux et s'accompagne d'un processus d'inhibition latérale altéré (Fode *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1999; Scardigli *et al.*, 2001).

Dans le SNC, *Ngn1* et *2* sont exprimés par les progéniteurs du futur cortex cérébral (partie dorsale du télencéphale). Chez les mutants LOF de ces gènes, la perte de leur expression ne conduit pas à une perte des progéniteurs neuronaux mais à une orientation des progéniteurs corticaux vers une destinée GABAergique. Ce changement de détermination est dû à l'expression ectopique du gène *Mash1* dans le cortex (Fode *et al.*, 2000).

Au niveau de la moelle épinière, le dernier membre de la famille neurogénine caractérisé chez la souris, *NGN3*, participe à la différenciation oligodendrocytaire (Lee *et al.*, 2003) (voir détails §3.2.5). Nous verrons dans la partie suivante (§4) qu'il a la particularité d'être également exprimé dans le pancréas où il joue le rôle d'un facteur pro-endocrine, en autorisant la formation de tous les types cellulaires endocrines qui composent les îlots de Langerhans (Gradwohl *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000a).

La double compétence neuronale et endocrine pancréatique de NGN3, semble mettre à jour des mécanismes moléculaires communs fortement conservés impliqués dans le choix de progéniteur, au cours du développement de deux tissus aussi distincts que le cerveau et le pancréas.

3.2.1.4 bHLH neuronaux certes, mais pas forcément proneuraux!

Il existe chez les vertébrés de nombreux gènes apparentés à AS-C, aux "*atonal* et *ARP*" spécifiquement exprimés dans le système nerveux. Leurs homologies de séquence permettent de les regrouper en 8 familles d'orthologues.

- Les Homologues d'*achaete-scute* [ash] dont le plus connu *mash1* répond à la définition de facteur proneural. Le second est *Mash 2* (voir **p46**). Son classement dans les bHLH neuronaux, repose sur des arguments suivants : (i) le clonage de *Mash 2* a été initialement obtenu à partir d'une lignée dérivée de la crête neurale de rat (Johnson *et al.*, 1990), (ii) *in vitro*, son implication a été proposée dans les cellules de Schwann du nerf sciatique chez l'adulte (Kury *et al.*, 2002). Cependant aucune autre preuve directe ne vient affirmer son implication dans le lignage neural.

Il n'existe pas non plus de nouveaux homologues murins du complexe *achaete-scute* isolés malgré le séquençage complet des génomes murins et humains.

- Les deux orthologues d'*atonal* *MATH1* et *MATH5* correspondent à des facteurs proneuraux.
- *Ngn1* et *2* sont des gènes proneuraux tandis que leur homologue d'arthropode, *biparous* ne l'est pas
- la famille [NeuroD] chez les vertébrés, comporte 4 membres *NEUROD*, *NEUROD2*, *MATH3*, *NEX1* et possiblement deux homologues drosophiliens *delilah* et *CG11450* (Ledent et Vervoort, 2001). Ils participent en aval de la fonction proneurale dans l'étape d'engagement neural après sélection des progéniteurs et ce de façon très similaire aux fonctions de *ase* et *cato*.
- Les [nato3] (nephew of atonal, *fer3* - (Moore *et al.*, 2000)) ou encore nommés N-TWIST (Neuronal twist) par homologie avec le facteur inhibiteur mésodermal M-TWIST forment avec *P48* une famille indépendante qui se discrimine des autres bHLH par un motif conservé [YEKRLSR/KI] entre la boucle et l'hélice II. Chez la mouche, *Dnato3*

orthologue de *Mnato3*, a été identifié par alignement *in silico* (FlyBase n°CG6913) (Segev *et al.*, 2001). Chez la souris comme chez la drosophile l'expression de N-twist se limite au système nerveux central. Il s'agit d'un bHLH particulier qui possède une action inhibitrice indirecte par séquestration des bHLH de classe I vis à vis des bHLH de classe tel que Mash1. Il a été démontré que son mode d'action empêche ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles de MASH1. Le mécanisme d'action de ce facteur représente une nouvelle voie de régulation au cours de l'évolution par compétition pour le recrutement des bHLH ubiquitaires (Verzi *et al.*, 2002).

- Les membres [nsc1] 1/et2 (Neurological SCL) ou NHLH1/HEN1 et NHLH2 comportent une forte homologie avec le facteur de transcription hématopoïétique SCL. Ils possèdent la particularité d'avoir au-delà du motif bHLH une séquence C-terminale minimale (6aa). Malgré leur forte homologie avec les SCL, les NSCL ne sont pas exprimés comme attendu dans le système hématopoïétique et leurs profils d'expression se recouvrent en grande partie dans différentes régions du SNC et du SNP embryonnaire et périnatales (Kruger et Braun, 2002). L'analyse phénotypique des souris mutantes invalidées pour ces deux gènes semble indiquer que ces deux gènes pourraient commander de concert la différenciation et la migration dans l'hypothalamus d'un sous-ensemble de neurones GnRH-1 (gonadotropin releasing hormone) qui proviennent des placodes olfactives (Kruger *et al.*, 2004). Dans le cortex, NSCL1 est susceptible d'agir en aval des gènes proneuraux au cours du processus de différenciation neuronale (Schuurmans *et al.*, 2004).
- La famille [olig] l'une des plus récentes sous familles bHLH isolées comporte les membres OLIG1, 2, 3 et les apparentés BHLH4/BETA4 et BHLH5/BETA3 (Lu *et al.*, 2000; Takebayashi *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Les gènes *Olig1* et *Olig2*, sont impliqués dans la génération des oligodendrocytes dans le cerveau et dans la moelle épinière respectivement (Lu *et al.*, 2002; Zhou et Anderson, 2002). OLIG1 et 2 sont d'excellents marqueurs du lignage oligodendrocytaire précoces. Il est maintenant bien établi que ces gènes fonctionnent comme des répresseurs. En effet, un facteur chimérique possédant le domaine de fixation à l'ADN d'*Olig2* et le domaine répresseur d'*engrailed* n'interfère pas dans la production des oligodendrocytes. Et inversement, la protéine de fusion entre la même séquence d'*Olig2* et un domaine activateur (comme VP16) inhibe la formation d'oligodendrocytes (Novitch *et al.*, 2001) ; (Zhou *et al.*, 2001).

Par des expériences de perte de fonction, il a été démontré que OLIG1 et 2 sont requis pour la production d'oligodendrocytes dans le SNC. Dans la moelle épinière embryonnaire, OLIG2 en partenariat avec NKX2.2 favorise la différenciation des oligodendrocytes alors que Olig1 contrôle la formation des oligodendrocytes corticaux (Sun *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2002; Zhou et Anderson, 2002; Lee *et al.*, 2005). Dans la moelle épinière, Olig2 contrôle séquentiellement la production des motoneurones puis celle des oligodendrocytes en interférant avec la fonction de NGN2 (Mizuguchi *et al.*, 2001; Novitsch *et al.*, 2001). La caractérisation de ces derniers membres bHLH a permis de mettre en évidence l'existence de certains bHLH neuronaux n'ayant pas de fonction proneurale intrinsèque mais qui sont tout de même capables d'influencer la spécification de types cellulaires.

L'analyse des gènes que nous venons de décrire, a permis de dégager la fonction proneurale de MASH1, NGN1, NGN2 et vraisemblablement de MATH1 et MATH5. La question qui vient alors à l'esprit est la suivante : l'ensemble de ces gènes est-il suffisant pour promouvoir la genèse de tous les progéniteurs neuraux?

Dans le SNP, les neurogénines sont responsables de la détermination des progéniteurs impliqués dans la formation de tous les ganglions sensoriels crâniens et spinaux (Fode *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1999), alors que MASH1 ne semble pas être indispensable à la genèse des progéniteurs des ganglions sympathiques (Sommer *et al.*, 1995). Il apparaît que dans le SNP la seule présence de ces trois proneuraux n'est pas suffisante pour définir la formation des progéniteurs neuraux, ce qui implique la fonction d'autres facteurs encore non identifiés.

Le rôle des gènes proneuraux n'a pas encore été examiné dans toutes les régions du SNC. Dans le télencéphale dorsal, la combinaison de MASH1, NGN1 et 2 exprimés tout trois dans cette région pourrait expliquer la genèse des cellules progénitrices du cortex cérébral (Fode *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2001). En revanche, *Mash1* est le seul gène proneural connu à être exprimé dans la partie ventrale du télencéphale. Bien qu'une large fraction des progéniteurs dans ce territoire soit absente chez le mutant *Mash1*^{-/-}, d'autres persistent et se différencient normalement (Casarosa *et al.*, 1999; Horton *et al.*, 1999). Tout comme dans le SNP, la fonction de gènes déjà connus ou de nouveaux gènes possédant une activité proneurale, restent à identifier dans le SNC. La situation semble plus simple dans la région de la moelle épinière où les produits des gènes *Mash1*, *Math1*, *Ngn1* et *Ngn2* sont exprimés par un grand

nombre de progéniteurs à l'exception du territoire le plus ventral exprimant exclusivement *Ngn3*. Si ce dernier possède une activité proneurale, les étapes de détermination et de spécification neurales pourraient être en grande majorité contrôlées et gérées par des facteurs bHLH.

De nombreux gènes et voies de transduction impliqués dans la progression du lignage neural sont dépendants de l'activation des gènes proneuraux. Un rôle essentiel des protéines proneurales est de limiter leur propre activité pour arrêter un choix des progéniteurs neuraux en inhibant leur propre expression dans les cellules adjacentes, empêchant de ce fait ces dernières de se différencier. Dans le chapitre précédent (§3.1.4) nous avons détaillé chez la drosophile, les mécanismes de l'inhibition latérale ou voie de signalisation Notch. Le processus d'inhibition latérale impliqué dans la destinée neuronale est un mécanisme conservé au cours de l'évolution, de la drosophile aux vertébrés supérieurs. Aussi, nous ne développerons dans le paragraphe suivant que les points conservés et ceux qui diffèrent sans revenir sur la mécanistique de la voie Notch.

3.2.2 Voie de signalisation Notch

Les études génétiques (GOF/LOF) menées chez la souris, le xénope et le poisson zèbre confirment le fait que l'inhibition latérale participe au choix des progéniteurs neuronaux dans le système nerveux.

3.2.2.1 Gènes neurogéniques

Nous venons de répertorier la diversité des bHLH homologues des facteurs proneuraux de drosophile et d'identifier les orthologues ayant conservé une fonction proneurale. C'est en établissant les phénotypes LOF et GOF que certains d'entre eux se retrouvent exclus d'une fonction proneurale mais peuvent être intégrés dans les facteurs neurogéniques. L'augmentation de la diversité des homologues vertébrés se retrouve aussi pour le groupe des facteurs neurogéniques. Le **Tableau 8** permet de visualiser la correspondance existante entre les facteurs neurogéniques de la drosophile et leurs homologues chez les vertébrés. On peut les subdiviser en trois catégories : les facteurs transmembranaires impliqués dans l'induction

de l'inhibition latérale [homologues de Notch/Delta] ; les cofacteurs [homologue de Su(H) et groucho] ; les effecteurs [homologues de E(spl)-C].

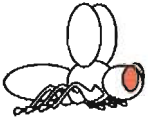
Gènes neurogéniques	Homologues neurogéniques	fonctions
		
<i>Delta/serrate</i>	Dll1, Dll3, Dll4, Jagged 1, 2	Ligands transmembranaires
<i>Notch</i>	Notch1 à Notch4	Récepteurs transmembranaires
<i>suppressor of Hairless</i> Su(H)	CBF1/RBP-Jk	Régulation de la transcription Co-facteurs
Complexe E-(Spl)	Hes1 à 7 Her/Hey related genes	Régulation de la transcription Effecteur/gènes cibles
<i>Groucho</i>	TLE	Régulation de la transcription Co-facteurs

Tableau 8 Correspondance entre facteurs neurogéniques drosophiliens et vertébrés

3.2.2.1.1 Notch, delta & Co

Les gènes homologues de *Notch* sont au nombre de quatre *Notch* 1 à 4 nommés récepteurs **LNG** [*Lin12*_{nématode}, *Notch*_{vertébré/drosophile} et *Glp*_{nématode}]. Du côté des ligands, les protéines suivantes contiennent un motif commun DSL (*delta*_{vertébré/drosophile}, *serrate*_{drosophile} et *lag-2*_{nématode}) : trois protéines delta ou Dll (*delta-like* Dll1, Dll3 et Dll4) et deux protéines jagged-1 et -2. Tout comme pour les gènes proneuraux, les gènes orthologues de *Delta* et *Notch*, possèdent de fortes conservations structurelles et fonctionnelles (Akazawa *et al.*, 1992; Sasai *et al.*, 1992; Bettenhausen *et al.*, 1995; Lindsell *et al.*, 1995; Lindsell *et al.*, 1996; Bae *et al.*, 2000; Hatakeyama et Kageyama, 2004).

Les premières hypothèses concernant la fonction de NOTCH1 et DELTA1, ont été posées en observant leur expression dans des conditions normales. Dans toutes les régions de la plaque neurale où a lieu la neurogenèse, le gène *Notch1* est exprimé dans la totalité des cellules. En revanche, les cellules exprimant le produit du gène *Delta1* forment des sous groupes de cellules post-mitotiques dispersées. Leur expression se termine lorsque les cellules qui les

expriment sortent de la zone ventriculaire pour poursuivre leur différenciation. Afin de révéler leurs fonctions précises au cours de la neurogenèse chez les vertébrés, ces gènes ont été tout d'abord surexprimés chez l'embryon de xénope. La surexpression de Delta, ou d'une forme constitutivement active de Notch, inhibe les étapes de la neurogenèse primaire. Les études du phénotype des souris transgéniques mutantes pour *Notch1* (Conlon *et al.*, 1995) et *Dll1* (Hrabe de Angelis *et al.*, 1997) avaient montré l'importance de ces gènes dans la segmentation de l'embryon mais n'avaient pas pu montrer leur effet sur la neurogenèse en raison de la létalité embryonnaire précoce (E9,5 et E10.5 respectivement) qui accompagne ces mutations. Cependant, les souris déficientes pour *Notch1* montrent une neurogenèse précoce et une hyperplasie neuronale corrélée à une augmentation de l'expression de *NeuroD*, *Ngn1* et *NSCL1* (de la Pompa *et al.*, 1997). L'utilisation de mutants conditionnels Cre-Lox, a permis de démontrer l'importance du facteur Notch dans le développement du neuroépithélium où il maintient les précurseurs neuraux dans un état indifférencié et contrôle leur différenciation (Lutolf *et al.*, 2002). Une inhibition de NOTCH1 apparait suffisante pour induire la neurogenèse mais ne permet pas la différenciation des neurones produits. De plus, les neurones et cellules gliales produites sont éliminés par apoptose.

L'invalidation des autres gènes *Notch* murins, montre des phénotypes différents pouvant être la conséquence chez ces mutants d'une compensation fonctionnelle par l'un des autres *Notch*.

La mutation de *Dll1* montre une perte de l'expression de *Hes5* et une augmentation de la neurogenèse dans le télencéphale.

D'autres ligands de la voie Notch ont été caractérisés comme deux orthologues de Serrate (drosophile) : Jagged [1 et 2] (Fleming, 1998; Lissemore et Starmer, 1999). Ils semblent agir comme des co-ligands qui ont la particularité de posséder un domaine de von Willebrand de type C impliqué probablement dans les processus de dimérisation. De plus, leurs domaines N-terminaux, moins conservés pourraient être impliqués dans la spécificité de liaison entre ligands et récepteurs. Plus récemment, de nouveaux ligands de notch chez les mammifères, structurellement proche des gènes de la famille *delta*, appelés *pref1* ou *delta-like* (Dlk) (Kaneta *et al.*, 2000; Baladron *et al.*, 2005) ou encore la F3/contactine et la NB3 activent la voie Notch et jouent un rôle dans la différenciation des oligodendrocytes (Cui *et al.*, 2004).

La multiplication des ligands et récepteurs de la voie de signalisation Notch permet une modulation plus fine des effets de cette voie et participe ainsi à l'organisation si complexe des organismes supérieurs. Il n'est donc pas étonnant de trouver plus d'homologues de *Notch* et

de *Delta* chez les mammifères que chez le nématode ou la drosophile. Par ailleurs, il existe des voies différentes de régulation en fonction du ligand ou du récepteur considéré. Néanmoins, il semblerait que pour certaines fonctions, les éléments de la voie Notch soient interchangeables.

Cette multiplication des gènes a pour corollaire une augmentation de la complexité de la fonction Notch, de telle sorte qu'à l'heure actuelle, ses modes de fonctionnement restent mal connus.

De plus, les récepteurs Notch subissent des modifications post-transcriptionnelles de types fucosylation et glycosylation. Ces modifications vont moduler l'affinité des récepteurs pour leurs ligands (Haines et Irvine, 2003; Schweisguth, 2004). La fucosylation des motifs EGF de Notch est nécessaire pour permettre l'interaction entre Notch et ses ligands. Plus les motifs seront fucolysés, plus l'affinité des DSL pour Notch sera importante (Okajima et Irvine, 2002; Panin *et al.*, 2002; Sasamura *et al.*, 2003; Shi et Stanley, 2003).

3.2.2.1.2 Co-facteur et effecteurs

Les effecteurs de la voie Notch sont regroupés sous l'appellation CSL pour CBF1_{mammifère}, Su(H)_{drosophile}, Lag_{nématode}. Le plus connu correspond au gène *RBP-Jκ* (recombining binding protein suppressor of hairless) (Akazawa *et al.*, 1992; Sasai *et al.*, 1992; Bettenhausen *et al.*, 1995; Jarriault *et al.*, 1995; Lindsell *et al.*, 1995; Tamura *et al.*, 1995; Lindsell *et al.*, 1996; Bae *et al.*, 2000; Hatakeyama et Kageyama, 2004). Les embryons homozygotes mutants pour *RBP-Jκ* meurent à E11.5j de gestation ; leur phénotype est plus étendu que celui des mutants Notch1, ce qui abonde dans le sens d'une redondance fonctionnelle inter-orthologues de Notch chez les mammifères et d'un rôle crucial de RBP-Jκ. En présence de la partie protéolysée de Notch, RBP-Jκ forme un dimère. Le complexe ainsi formé est un activateur transcriptionnel qui stimule l'expression des gènes *Hes*.

3.2.2.1.3 Les gènes cibles de l'activation de Notch

Les homologues des *E(spl)-C* isolés chez les mammifères sont les *Hes* (hairy enhancer of split genes), *Her* (HES-related genes) et *Hey*. HES constitue une famille de répresseurs transcriptionnels qui régulent négativement l'expression de facteurs de transcription tissus spécifiques (Ohsako *et al.*, 1994; Iso *et al.*, 2003).

En surexpression dans des embryons de souris, les deux HES 1 et 5 conduisent à un maintien des cellules souches à l'état indéterminé, provoquant ainsi une différenciation tardive (Ohtsuka *et al.*, 2001).

Chez les vertébrés, l'activation de HES1, HES5, HES7, ESR1, ESR4, ESR5, ESR6, ESR7, est sous la dépendance de Notch (de la Pompa *et al.*, 1997; Wettstein *et al.*, 1997; Deblandre *et al.*, 1999; Jen *et al.*, 1999; Ohtsuka *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2000; Iso *et al.*, 2003). Par contre HES6, HES3 et ESR6 ne semblent pas en être des effecteurs primaires (Bae *et al.*, 2000; Koyano-Nakagawa *et al.*, 2000; Davis et Turner, 2001). Un effet positif dans la différenciation du système nerveux a été démontré pour HES6, celui-ci pouvant interagir avec HES1 (Bae *et al.*, 2000; Koyano-Nakagawa *et al.*, 2000).

3.2.2.2 Signalisation Notch : tout comme chez la drosophile et pourtant...

La voie de signalisation Notch est un mode de communication très fortement représenté chez tous les métazoaires à l'exception des plantes. Ces fonctions sont multiples mais toutes permettent à des progéniteurs initialement identiques de s'engager dans des voies de différenciation radicalement différentes. Au cours de la neurogenèse dans des organismes aussi distincts que la drosophile et la souris, cette signalisation présente des similitudes remarquables aussi bien d'un point de vu moléculaire que mécanistique.

Tout comme chez la drosophile, les gènes proneuraux vertébrés sont exprimés en groupes de cellules équivalentes au faisceau proneural. Tout comme chez la drosophile, la restriction de la fonction proneurale aux progéniteurs désignés est médiée par inhibition latérale.

Comme chez la drosophile, l'événement clé du processus d'inhibition latérale est l'activation de la transcription du récepteur du signal d'inhibition et ce directement et proportionnellement dépendant de la quantité de facteurs proneuraux (Chitnis et Kintner, 1996).

- ❖ [S2] TACE (TNF-Alpha Converting Enzyme ou ADAM-17 ; (Brou *et al.*, 2000) ; une enzyme de type métalloprotéase, membre de la famille ADAM (a disintegrin and metalloprotease) permet le clivage extracellulaire,
- ❖ [S3] complexe multiprotéique γ -sécrétase (préséniline ou PS) constituant la partie active du complexe protéique (Fortini, 2001; De Strooper, 2003).

Ce dernier clivage provoque la libération de la partie C-ter de Notch souvent abrégée Notch-IC ou ICN qui est transporté dans le noyau, grâce à la présence de signaux de localisation nucléaire (NLS), où il régule l'expression de gènes cibles en s'associant avec d'autres facteurs nucléaires comme les membres de la famille CSL (C promoter binding factor/Suppressor of hairless/Lag-1 transcription factor) (Fortini, 2002). La liaison de l'ICN aux CSL dans le noyau se fait au niveau de la séquence RAM et lève l'effet répresseur de CSL en activant la transcription des gènes cibles comme les facteurs de transcription de la famille *Hes*; (Chen *et al.*, 1997; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

3.2.2.3 Voie Notch comparaison entre fonction proneurale et ses autres activités

De nombreuses études LOF etGOF des gènes de la voie Notch chez la souris ont été menées et permettent de retracer l'ensemble de ces fonctions au cours de la neurogenèse (Grandbarbe *et al.*, 2003; Yoon et Gaiano, 2005) et de les replacer dans le contexte général de la voie de transduction Notch.

Le rôle de la voie Notch dans le déterminisme cellulaire est le plus souvent de maintenir la cellule, dans laquelle Notch est activé, dans un état indifférencié, la rendant capable de répondre à des signaux ultérieurs. Cette cellule est alors dite compétente. La voie Notch peut jouer sur le devenir cellulaire selon trois mécanismes principaux :

(i) le mode inductif, unidirectionnel. Ce cas de figure existe lorsqu'une des cellules exprime uniquement le ligand tandis que la cellule voisine n'exprime que le récepteur, ce qui a pour effet d'engager ces deux cellules vers des devenirs cellulaires distincts et ce de façon quasi-irréversible.

(ii) le mode permissif par inhibition latérale, bidirectionnel. Il s'agit du mécanisme d'action le plus étudié, il s'exerce au sein d'un groupe de cellules ayant les mêmes potentialités développementales. Ce mécanisme a été initialement étudié dans le déterminisme neuronal chez la drosophile (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1991; Artavanis-Tsakonas et Simpson, 1991;

Heitzler et Simpson, 1991). L'inhibition latérale semble se dérouler uniformément en trois phases : (1) initialement, toutes les cellules expriment ligands et récepteurs dans les mêmes proportions. (2) ensuite, une des cellules exprime plus de ligands que de récepteurs suite à une induction par des signaux extrinsèques ou suite à un dérèglement spontané de l'équilibre ligands/récepteurs. (3) finalement, le déséquilibre est amplifié par une boucle de régulation de la voie Notch. Cette dernière étape ressemble à la signalisation par induction décrite ci-dessus. **(iii)** La division asymétrique (Artavanis-Tsakonas et Simpson, 1991; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995; Kimble et Simpson, 1997; Roegiers et Jan, 2004). Par exemple, au cours de la neurogenèse chez la drosophile, c'est la distribution asymétrique à la surface des neuroblastes d'un inhibiteur de Notch, Numb, qui va conduire à la production de deux cellules filles différentes. En effet, Numb ne reste présent que dans l'une des cellules filles où il inhibera la voie Notch.

Ces trois modes sont naturellement non exclusifs. Trois fonctions semblent se dégager pour l'activation de la voie Notch : **(1)** pour la transition des cellules souches neurales primitives aux cellules souches neurales définitives et/ou **(2)** pour leur maintien à l'état de cellules souches neurales définitives et pour ainsi **(3)** réprimer leur différenciation en cellules du lignage neuronal ou glial. (Adapté de (Hitoshi *et al.*, 2004)).

3.2.3 Activité proneurale et Cycle cellulaire

Il existe un couplage spatio-temporel étroit entre neurogenèse et cycle cellulaire. En effet, l'entrée en différenciation des cellules progénitrices modifie leurs capacités mitotiques. L'une des étapes cruciales étant l'arrêt de prolifération des cellules quittant la zone de neurogenèse (zone ventriculaire). Cette étape est proposée comme mécanisme permettant d'isoler les progéniteurs de l'influence d'autres facteurs de détermination extrinsèques et intrinsèques (Edlund et Jessell, 1999; Cremisi *et al.*, 2003). Sa régulation précise est le garant de la balance entre prolifération et différenciation (Ohnuma et Harris, 2003). Elle est guidée principalement par deux mécanismes impliqués dans le maintien ou l'arrêt de prolifération : inhibition latérale et division asymétrique (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000; Roegiers et Jan, 2004).

Le réseau de facteurs engagés dans la coordination de ces deux mécanismes dépasse largement les bHLH proneuraux et semble dépendant de la spécification des sous-types cellulaires engagés (Torii

et al., 1999; Li et Vaessin, 2000; Cremisi *et al.*, 2003). De nombreux points concordent et semblent indiquer que les gènes proneuraux s'impliquent non seulement dans la détermination du destin neuronal des progéniteurs (voir prochain paragraphe §3.2.4), mais également favorisent l'arrêt de leur division cellulaire. Cependant nous nous bornerons aux relations existantes entre activité des gènes proneuraux et la machinerie du cycle cellulaire. Par exemple, la surexpression de *Ngn2* dans le tube neural de l'embryon de poulet a pour résultat de précipiter à la fois la sortie du cycle cellulaire et la différenciation prématurée des cellules neuroépithéliales (Mizuguchi *et al.*, 2001; Novitsch *et al.*, 2001).

Cette régulation du cycle cellulaire par les gènes proneuraux chez les vertébrés est susceptible d'impliquer l'activation d'inhibiteurs des protéines CDK (cyclin dependent kinase) souvent appelés les CDKI [cyclin depend kinase inhibitor] tels que les membres de la famille CIP/Kip p21/cip1, p27/kip1 et p57/kip2 (Carey *et al.*, 2002). L'activation directe de ces gènes pourrait avoir lieu dans certains lignages en même temps que l'apparition des premiers marqueurs de différenciation neuronale (action des gènes pan-neuronaux). *In vitro* dans des cellules Hela, la surexpression de *NeuroD* semble activer l'expression de P21/cip1 (Mutoh *et al.*, 1998). *In vivo*, chez les souris *NeuroD*^{-/-} les mêmes auteurs ont observé une élévation de l'expression de P21/cip1 ainsi que des mitoses ectopiques au niveau de l'épithélium entérique de ces souris.

En revanche, la surexpression de *Ngns* et *Mash1* dans des cellules P19 induit l'expression de la kinase inhibitrice P27/kip1. Cette élévation du niveau P27/kip1 précède la différenciation neuronale et est corrélée avec la sortie de cycle (Farah *et al.*, 2000). Chez les souris *p27Kip1*^{-/-}, globalement la masse cérébrale est augmentée (Fero *et al.*, 1996; Nakayama *et al.*, 1996). Cependant, certaines régions du système nerveux semblent plus touchées que d'autres. D'autres arguments de spécificités des facteurs de régulation du cycle cellulaire existent. Par exemple, *in vitro*, il est intéressant de noter que contrairement aux cellules Hela, les cellules P19 ne sur-expriment pas P21/cip1, ce qui peut laisser penser que les protéines du cycle cellulaire en interaction avec les mécanismes de différenciation neurale pourraient être dépendantes du type cellulaire. D'autres protéines comme les cyclines se trouvent réparties de façon inégale en fonction du territoire neuronal étudié : l'expression des cyclines D1 est fortement restreinte à la rétine et au cervelet (Fantl *et al.*, 1995) ; tandis que postérieurement, les cyclines D1 et D2 sont exprimés dans des rhombomères distincts (Wianny *et al.*, 1998). Les souris invalidées pour les gènes des cyclines D1 et D2 montrent comme phénotype des

défauts de prolifération uniquement dans leurs régions d'expression respectives (Fantl *et al.*, 1995; Sicinski *et al.*, 1995).

In vivo, Ohnuma *et al.*, ont identifié au niveau des ganglions rétiniens de l'embryon de xénope, une surexpression des gènes proneuraux tandis que les acteurs de la machinerie de cycle cellulaire, *cdks* et *cyclines* se voient sous exprimés et cela uniquement lors de la dernière division, soit avant l'arrêt du cycle cellulaire et de la différenciation. Dans le même modèle d'amphibiens, des expériences récentes ont fourni de nouveaux arguments d'interactions entre protéines proneurales impliquées dans la différenciation neuronale et la régulation du cycle cellulaires (Vernon et Philpott, 2003). L'utilisation de morpholinos inhibant l'expression de *p27(Xic1)*, empêche la différenciation des neurones primaires, alors que sa surexpression favorise la formation ectopique de neurones et stabilise la protéine proneurale X-NGNR-1 (Vernon et Philpott, 2003).

Le lien entre cycle cellulaire et fonctions proneurales n'est pas réservé qu'aux vertébrés. Chez la drosophile, les preuves liant activité des gènes neuronaux tels que *asc*, les partenaires de la voie Notch, et les éléments régulateurs du cycle cellulaire tels que *string-cdc25* ; *dacapo-cdk inhibitor-p27* s'accumulent aussi (Wallace *et al.*, 2000; Baonza et Freeman, 2005).

Ainsi, les mécanismes couplant le devenir des cellules neuronales et le cycle cellulaire interviennent à différentes étapes pendant le développement neural. Les facteurs intrinsèques commandent la prolifération des cellules et le changement de compétence de certaines cellules en fonction des territoires du système nerveux. Tandis que les composants de la machinerie du cycle cellulaire pourraient jouer un rôle important de synchronisation de la genèse des différents types cellulaires. La combinaison de facteurs extr/intr-insèques et des éléments du cycle cellulaire permet la progression d'une cellule progéniteur neurale dans l'espace et dans le temps. Ce qui implique la migration de ces cellules au cours de leur processus de différenciation (migration centrifuge de la ZV vers la périphérie du tube neural).

Un dernier point important fait apparaître une réciprocité de la fonction des facteurs de cycle cellulaire qui participent aussi au mécanisme de spécification des cellules progénitrices. Récemment, l'implication des membres des CDKIs a été suggérée pour jouer des rôles centraux dans la différenciation neurale (Levine *et al.*, 2000; Carruthers *et al.*, 2003). *In vitro*, l'augmentation graduelle de *P27/Kip 1* dans des cultures de cellules progéniteurs gliaux, entraîne une accumulation qui une fois conséquente, induit la sortie du cycle et la différenciation des précurseurs oligodendrocytaires (Durand et Raff, 2000). Si l'augmentation

de P27Kip1 est accélérée, les oligodendrocytes se différencient après un nombre de divisions réduit, suggérant que les cellules puissent adapter leurs temps de prolifération en suivant l'accumulation des inhibiteurs de cycle cellulaires. Le même phénomène est observé pour P27Xic1 dans la rétine du xénope. Dans ce système, P27Xic1 semble être une molécule bi-fonctionnelle, directement impliquée dans la différenciation des cellules gliales de Müller. Sa surexpression conduit non seulement à précipiter la sortie de cycle anticipée, mais transforme également la plupart d'entre elles en cellules gliales de Müller.

3.2.4 Gènes proneuraux et spécification de sous types neuronaux chez les vertébrés.

Le fait que l'expression de certains facteurs proneuraux soit exclusivement restreinte aux progéniteurs présents dans certains territoires suggère qu'ils peuvent participer à la production des types particuliers de neurones. Par exemple, au niveau du tube neural postérieur, les gènes *Math1*, *Ngn1* et *Mash1* sont exprimés dans des territoires distincts selon l'axe dorso-ventral et sont à l'origine de la production de types d'interneurones distincts (Gowan *et al.*, 2001). L'analyse de souris mutantes pour ces facteurs a prouvé que les activités de *Math1* et *Ngn1* sont essentielles à une spécification correcte des populations de progéniteurs (Bermingham *et al.*, 1999; Gowan *et al.*, 2001). Un autre exemple est celui des neurogénines dans le télencéphale, où NGN1 et NGN2 sont exprimés dans les progéniteurs dorsaux du cortex cérébral tandis que MASH1 est exprimé ventralement (Casarosa *et al.*, 1999; Horton *et al.*, 1999; Fode *et al.*, 2000; Schuurmans et Guillemot, 2002; Marin et Rubenstein, 2003; Schuurmans *et al.*, 2004).

3.2.4.1 MASH1 / NGN2 dans le télencéphale

La situation dans le télencéphale est intéressante en termes de régionalisation des sous-types neuronaux. En effet, la zone germinale du télencéphale dorsal (le *pallium*) est le lieu de différenciation des neurones excitateurs glutamatergiques, qui envoient des projections vers le cortex cérébral, tandis que les progéniteurs situés ventralement (le *subpallium*) se différencient majoritairement en neurones inhibiteurs GABAergiques (neurones des ganglions de la base ou interneurones qui migrent tangentiellement pour contribuer à la formation du cortex). MASH1 est impliqué dans le processus de spécification dans le domaine ventral du télencéphale (Casarosa *et al.*, 1999), qui produit principalement les neurones

GABAergiques. Son expression forcée dans des régions plus dorsales, induit l'expression ectopique de marqueurs des neurones sythétisant le GABA (acide γ -aminobutyrique) (Fode *et al.*, 2000; Parras *et al.*, 2002).

L'étude des mutants *Ngn1* et *Ngn2* a permis d'établir le rôle de MASH1 dans la spécification du sous-type neuronal GABAergique. Chez les souris *Ngn2*^{-/-} et d'une façon plus dramatique chez les doubles mutants invalidés pour *Ngn1*&2, le phénotype des progéniteurs corticaux apparaît clairement re-spécifié en destin ventral (GABAergique). Chez ces mutants, le nombre de neurones produits semble normal et les marqueurs des progéniteurs corticaux sont exprimés normalement. L'absence d'expression des gènes proneuraux *Ngn1* et 2 a pour conséquence une forme de compensation fonctionnelle par expression ectopique de *Mash1* dans la région corticale. La présence de MASH1 dans le territoire dorsal du télencéphale provoque cette re-spécification GABAergique (Fode *et al.*, 2000; Schuurmans *et al.*, 2004). D'autres compensations fonctionnelles pourraient intervenir en cas d'invalidation de gènes proneuraux et interférer dans l'analyse des mutants "perte de fonction", complexifiant ainsi l'étude de la fonction multiple des gènes proneuraux.

Une nouvelle approche permettant d'appréhender la fonction propre d'un gène proneural est de le placer dans l'environnement de celui qu'il compense. Des mutants dans lesquels les séquences génomiques de *Mash1* et *Ngn2* ont été permutées sont utilisés. Le mutant *Mash1*-KI-*Ngn2* exprime la séquence codante de *Ngn2* sous le contrôle du contexte génomique de *Mash1*. L'analyse de telles souris mutantes a permis de démontrer que les progéniteurs neuronaux se différenciaient toujours normalement sans re-spécification. Réciproquement, la mutation *Ngn2*-KI-*Mash1* engage une re-spécification des neurones corticaux vers un destin GABAergique dans le télencéphale, ainsi qu'une conversion des motoneurones en interneurones dans le tube nerveux postérieur (Parras *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent fortement que NGN2 est davantage dépendant de la présence de cofacteurs localement exprimés que MASH1 pour la détermination des sous-types neuronaux.

NGN2 favorise la neurogenèse (Nieto *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001) et le caractère dorsal des neurones télencéphaliques par la répression du gène proneural ventral *Mash1* (Fode *et al.*, 2000). De plus, il est impliqué dans les aspects multiples du phénotype neuronal glutamatergique, dans la morphologie dendritique de ces cellules et favorise la migration radiale (Schuurmans *et al.*, 2004). Ces dernières particularités de la fonction de NGN2

semblent exiger la phosphorylation d'un résidu tyrosine particulier de NGN2 en dehors du domaine de bHLH ouvrant ainsi de nouvelles pistes permettant d'expliquer la multifonctionnalité de facteurs proneuraux.

3.2.4.2 Autres gènes de spécificité de sous type neuronal

Parmi les bHLH neuronaux, peu sont pourvus d'une fonction proneurale. Ils sont néanmoins impliqués dans la spécification de divers types neuronaux. Par exemple, NEUROD ou MATH3 sont impliqués dans les mécanismes de spécification de l'identité neuronale dans la rétine en collaboration avec le produit des gènes à homéoboîte tel que *Chx10* ou *Pax6* (Cepko, 1999; Morrow *et al.*, 1999; Hatakeyama *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2002).

3.2.4.3 Bilan

En conclusion, Bertrand *et al* proposent une fonction des gènes proneuraux, qui consiste à amorcer à la fois un programme générique de développement neuronal et un ensemble de programmes spécifiques à chaque sous-type neuronal, spécifiés par le contexte régional particulier dans lequel les progéniteurs sont localisés. Les facteurs proneuraux doivent donc réguler un panel de gènes cibles tantôt communs tantôt divergents. Le mécanisme moléculaire responsable de ces régulations est toujours en grande partie inconnu. Toutefois, des pistes peuvent être avancées, en combinant la spécificité des séquences d'ADN ciblées et la présence de cofacteurs spécifiques qui modulent l'activité des protéines proneurales. L'étude fine des boîtes E et de leurs régions adjacentes dans les gènes cibles suggère qu'un mécanisme de compétition et/ou d'affinité pour certaines boîtes E puisse exister et être responsable de la spécificité de réponse de ces gènes (Ben-Arie *et al.*, 2000; Rebeiz *et al.*, 2005) comme cela a été démontré récemment chez la drosophile (Ramain *et al.*, 2000). Chez la souris, dans le tube neural postérieur, la spécification de sous-types de motoneurones (MN) s'effectue grâce à la synergie entre NGN2 et NEUROM et les facteurs de spécification des MN : LIM-HD (LIM à homeoboîtes) ISL1 et LHX3. Ces complexes induisent l'expression de gènes de différenciation des MN tel que *Hb9*. Le mécanisme le plus probable pour cette coopérativité est basé sur la capacité des bHLH et des protéines LIM-HD d'interagir *via* la protéine adaptateur NLI, ce qui permet de synchroniser la spécification de sous-types neuronaux et la

neurogenèse (Lee et Pfaff, 2003). Ainsi le facteur NLI semble servir de pont entre bHLH et LIM-HD d'une manière semblable aux interactions coactivatrices décrites entre Chip, Pannier (homologue drosophilien des GATA) et l'hétéro-dimère Scute-daughterless de la drosophile nécessaire à la détermination des neurones composant les organes sensoriels externes (Romain *et al.*, 2000; zur Lage *et al.*, 2004).

3.2.5 Gènes proneuraux et spécification gliale chez les vertébrés

Les oligodendrocytes, comme les astrocytes et les neurones, dérivent des cellules neuroépithéliales du tube neural. Les données actuelles concernant la mise en place des lignages gliaux suggèrent que la spécification de ces cellules est gouvernée par des mécanismes comparables à ceux mis en jeu au cours de la genèse des populations neuronales. Nous avons rappelé dans le § 3.2.1 que les neurones et les cellules gliales sont générés à partir de progéniteurs communs qui possèdent cette bipotentialité (Temple, 2001). Les résultats obtenus par traçage à l'aide de vecteurs rétroviraux *in vivo*, (Turner et Cepko, 1987; Walsh et Cepko, 1992; Leber et Sanes, 1995) ou dans des cultures primaires (Levison et Goldman, 1997) indiquent que les deux options de différenciation neuronale ou gliale peuvent être adoptées par des progéniteurs communs. Cette dichotomie est observée naturellement *in vitro*, sans aucune sélection, suggérant qu'une horloge moléculaire interne dirige en partie, la génération des neurones dans un premier temps puis dans un second des cellules gliales (Sauvageot et Stiles, 2002).

Il paraissait important d'identifier les régulateurs responsables de ce choix séquentiel, entre-autres de tester la fonction des bHLH proneuraux.

3.2.5.1 Régulation de la neurogenèse au profit de la gliogenèse

Les gènes tels que *Hes1* et *5*, *Hesr2*, *Id1* et *3*, dont la fonction d'antagonistes de la voie neuronale est connue, sont capables d'induire la gliogenèse aux dépens de la neurogenèse (Cai *et al.*, 2000; Satow *et al.*, 2001).

3.2.5.2 Fonction des gènes proneuraux

Les gènes proneuraux sont des déterminants intrinsèques qui font partie probablement du "switch" ou commutateur de la neurogenèse vers la gliogenèse.

En effet, chez les embryons mutants *Mash1*^{-/-}, ou *Ngn2*^{-/-}, la détermination neuronale est bloquée dans la zone ventriculaire du tube neural au profil d'une différenciation prématurée des cellules gliales. Ceci constitue un premier argument en faveur du rôle de ces mêmes bHLH dans ces deux lignages (Fode *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2000; Nieto *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que l'expression de *Mash1* et *Ngn2* a été rapportée dans les précurseurs oligodendrocytaires et astrocytaires, respectivement (Kondo et Raff, 2000; Nieto *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

Dans la rétine, la non expression d'un seul bHLH proneural est suffisante pour induire la différenciation neuronale et empêcher la différenciation des cellules gliales de Müller (Cai *et al.*, 2000; Inoue *et al.*, 2002).

Dans la moelle épinière, la présence de Neurogénine 2 semble réprimer la spécification des oligodendrocytes. La diminution de l'expression de ce facteur a été proposée comme mécanisme d'apparition des premières cellules gliales en différenciation marquant la transition entre neurogenèse et oligodendrogenèse dans ce territoire (Zhou *et al.*, 2001).

NGN1 semble aussi impliqué dans le freinage de la voie qui conduit à la formation des astrocytes. Deux mécanismes indépendants sont proposés. Le premier implique le complexe p300/CBP coactivateur présent en quantité limitante dans une cellule proneurale et donc sujet à régulation/compétition lors de son recrutement sur les séquences activatrices des gènes neurogéniques ou gliogéniques (Goodman et Smolik, 2000; Sun *et al.*, 2001). *In vitro*, NGN1 semble empêcher le destin astrocytaire en séquestrant le complexe de p300/CBP loin des gènes spécifiques des cellules gliales, comme le gène codant la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein). Le second mécanisme met en évidence une inhibition directe par Ngn1 de la voie de signalisation JAK/STAT, impliquée dans l'activation de la différenciation astrocytaire (Bonni *et al.*, 1997). Les facteurs gliogéniques tels que les BMP (Bone Morphogenetic Protein) et CNTF (Ciliary NeuroTrophic Factor) stimulent en synergie la transcription du marqueur astrocytaire GFAP par induction de la formation d'un complexe p300/CBP-Stat 1 et -Stat3[Signal Transducer and Activator of Transcription]-Smad 1 [Mothers Against Decapentaplegic homologue].

Une étude récente a proposé, au niveau du cortex cérébral, la combinaison de deux mécanismes indépendants pouvant expliquer la dualité de la fonction de ngn1 : (i) NGN1 interfère directement avec la formation du complexe p300/CBP-Smad-Stat1/3 et empêche la transcription des gènes pro-gliaux ; (ii) ngn1 agit indirectement sur ce complexe par inhibition de la

phosphorylation des STAT 1/3, et donc participe au renforcement de la transcription des gènes neuronaux cibles de NGN1 (Sun *et al.*, 2001).

- Switch motoneurones-oligodendrocytes dans le tube neural caudal

La position des précurseurs des oligodendrocytes (OLPs) dans le neuroépithélium ventral est en relation avec les domaines d'expression des facteurs de transcription à homéodomaine, qui sont à l'origine de la régionalisation dorso-ventral de moelle épinière embryonnaire. Cette distribution a été détaillée afin de comprendre les éléments nécessaires et/ou suffisants à la spécification du lignage glial.

Dans la moelle épinière de l'embryon de poulet, les précurseurs oligodendrogliaux vont émerger dans les domaines pMN et P3 limités ventralement par le territoire de la plaque du plancher et dorsalement chevauchent la région exprimant le facteur de transcription PAX6 (Soula *et al.*, 2001). C'est dans le domaine Pax6⁺ le plus ventral qu'a lieu la genèse des motoneurones (Ericson *et al.*, 1997). Pendant la phase de production des motoneurones, les gènes *Olig2* et *Nkx2.2* sont exprimés dans les domaines adjacents pMN et p3, respectivement. Juste avant l'émergence des précurseurs oligodendrocytaires, l'expression de NKX2.2 s'étend dorsalement dans le domaine pMN. Les OLPs provenant du domaine p3 semblent acquérir l'expression d'OLIG2 avant la fin de leur différenciation.

Chez la souris, la situation diffère. Les précurseurs des oligodendrocytes sont situés dans la partie la plus ventrale du domaine Pax6⁺ (Sun *et al.*, 1998). A des stades précoces, ils acquièrent l'expression de NKX2.2 seulement après avoir quitté le neuroépithélium. Aux stades plus tardifs de l'oligodendrogenèse, l'expression de NKX2.2 est activée dans le domaine pMN, comme dans la moelle épinière du poulet. Les OLPs Nkx2.2⁺ dérivant du domaine p3 pourraient également acquérir l'expression d'Olig2 après la migration (Fu *et al.*, 2002). Ces observations suggèrent d'une part une origine des oligodendrocytes différente chez les oiseaux et les mammifères (Soula *et al.*, 2001) et d'autre part, l'existence de précurseurs communs aux motoneurones et aux oligodendrocytes chez ces derniers (Sun *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 2000).

Sur une échelle de temps, il apparaît que l'initiation de la production des cellules progénitrices des oligodendrocytes à partir du progéniteur neuroépithélial situé dans le domaine pMN du tube neural postérieur, coïncide avec l'arrêt de la production des motoneurones (Sun *et al.*, 1998; Richardson *et al.*, 2000; Soula *et al.*, 2001). Cette observation soulève la question des

mécanismes moléculaires qui orchestrent cette transition. Pour y répondre, les modèles de LOF et GOF ont été utilisés. L'étude de la perte de fonction des gènes *Nkx2.2* et *Olig2* indique qu'ils sont impliqués dans le développement oligodendroglial. Dans la moelle épinière de souris dont le gène *Nkx2.2* est invalidé, des oligodendrocytes différenciés apparaissent en nombre très réduit et de manière retardée, suggérant que la protéine NKX2.2 est requise pour la différenciation et/ou la maturation des oligodendrocytes, mais pas pour leur détermination (Qi *et al.*, 2001). Les conséquences de l'inactivation de la fonction du gène *Olig2* (associée à celle du gène *Olig1*, ou non) montrent en revanche qu'elle est essentielle à la spécification des motoneurones et des oligodendrocytes dans la moelle épinière chez la souris (Lu *et al.*, 2002; Takebayashi *et al.*, 2002; Zhou et Anderson, 2002). La même conclusion a été obtenue chez le poisson zèbre (Park *et al.*, 2002). D'autre part, le début de l'expression des gènes de la myéline dans la moelle épinière suit dans le temps et dans l'espace la coexpression de OLIG2 et de NKX2.2 dans les cellules oligodendrocytaires. *In vitro*, la réduction de l'expression de l'un ou de l'autre de ces facteurs entraîne une diminution de l'expression des gènes de myéline et de la différenciation oligodendrocytaire.

Des expériences de gain de fonction réalisées dans la moelle épinière de poulet indiquent que l'expression forcée de *Olig2* est capable d'induire la formation de motoneurones ectopiques (Novitch *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001) mais n'est pas suffisante pour le développement des oligodendrocytes sauf lorsque le transgène est exprimé dans la région *Nkx2.2*⁺ (Zhou *et al.*, 2001). Confirmant cette donnée, la coexpression de NKX2.2 et de OLIG2 entraîne la formation prématurée et ectopique d'oligodendrocytes, ce qui n'est pas le cas de l'expression de NKX2.2 seul (Sun *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Par ailleurs, la protéine SHH qui est nécessaire et suffisante pour la spécification des oligodendrocytes (Orentas *et al.*, 1999; Soula *et al.*, 2001) et l'expression des facteurs NKX2.2 (Ericson *et al.*, 1997) et OLIG2 (Lu *et al.*, 2000), l'est également pour induire leur coexpression dans le neuroépithélium ventral, au moment de la détermination oligodendrogliale dans la moelle épinière du poulet. Ainsi, l'expression simultanée de OLIG2 et de NKX2.2 serait suffisante pour la formation des précurseurs oligodendrocytaires et des oligodendrocytes différenciés chez le poulet. Etant donné que les activités de SHH et d'OLIG2 sont requises continuellement pour la spécification des motoneurones puis des oligodendrocytes, il existe probablement d'autres facteurs contrôlant la transition entre la production des motoneurones et celle des oligodendrocytes.

De concert, l'expression des gènes proneuraux *Ngn1* et *Ngn2* (qui collabore avec *Olig2* pour la genèse des motoneurones) s'éteint dans les mêmes régions du neuroépithélium ventral (Novitch *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). De plus, l'expression forcée de OLIG2 n'est capable en elle-même d'induire le développement de précurseurs oligodendrocytaires que lorsque l'expression de *Ngn1* et *Ngn2* est inhibée ou lorsque NKX2.2 (qui réprime l'expression de *Ngn1* et *Ngn2*) est présent (Zhou *et al.*, 2001). Ces observations suggèrent que lorsque le programme pan-neurogénique est arrêté dans le domaine pMN, OLIG2 acquiert une nouvelle fonction en favorisant le développement de progéniteurs oligodendrocytaires (Mizuguchi *et al.*, 2001; Novitch *et al.*, 2001). Cependant, comme l'extinction de l'expression des Ngns se produit avant la coexpression de OLIG2 et de NKX2.2 dans le neuroépithélium ventral, le facteur responsable de l'initiation de ce processus potentiellement impliqué dans la spécification des oligodendrocytes reste à découvrir.

En parallèle, ces territoires qui exprimaient NKX2.2 (ventralement P3) et OLIG2 (pMN) de façon mutuellement exclusive se décalent l'un par rapport à l'autre pour créer une région chevauchante dans la zone dédiée à la production des motoneurones. C'est dans cet espace où s'expriment à la fois OLIG2 et NKX2.2, qu'apparaissent de façon dispersée les progéniteurs oligodendrocytaires, qui donneront après migration les cellules myélinisantes spécialisées de la substance blanche.

Il était donc déterminant de tester les propriétés d'OLIG2 par surexpression. L'expression ectopique d'*Olig2 in ovo*, au niveau du tube neural postérieur de l'embryon de poulet, ne permet pas d'induire seule la production des progéniteurs oligodendrocytaires (Zhou *et al.*, 2001). En revanche, la co-électroporation d'*olig2* avec *Nkx2.2* permet l'abolition de l'expression de *NGN1* et 2 et induit donc la production de progéniteurs oligodendrocytaires caractérisés par l'expression du facteur de transcription SOX10, dont le domaine de liaison à l'ADN est une boîte HMG (*high mobility group*), et du récepteur R α -PDGF (receptor α - platelet derived growth factor). Le scénario imputant à NKX2.2 la capacité de réprimer les deux Ngns est attrayant mais peu probable *in vivo*. En effet, temporellement, l'extinction de l'expression de ces deux Ngns dans la partie appropriée du neuroépithélium précède l'expansion dorsale de NKX2.2. Pourtant, l'abolition de l'influence de NGN1et2 semble être l'évènement clé du passage entre neurogenèse et gliogenèse.

- La mise en évidence de ce commutateur entre destinées neuronale et gliale soulève un bon nombre d'interrogations. L'une des questions importantes est la nature des cibles

directes d'OLIG2, de NKX2.2, et de NGN2 afin de déterminer quels genres d'événements moléculaires accompagnent la spécification des cellules neuroépithéliales. Est-ce que d'autres domaines neuroépithéliaux du tube neural sont le siège de la commutation entre production de cellules neuronales et production d'astrocytes ? Quel est le rôle d'OLIG1 ? Dans le tube neural postérieur ventral des rongeurs, OLIG1 est coexprimé avec OLIG2. L'analyse de la fonction d'OLIG1 par GOF dans des régions ventrales du tube neural de la souris prouvent qu'OLIG1 empêche la production des interneurons V3 uniquement, mais pas des interneurons V2 ou des motoneurons (Sun *et al.*, 2001)

- Recherche d'autres éléments intervenant dans l'oligodendrogenèse

A partir de cellules progénitrices gliales issues de la moelle épinière embryonnaire, Lee *et al* (2003) ont isolé *Ngn3*, dont la fenêtre temporelle d'expression, correspond à celle de la neurogenèse et de la gliogenèse précoce. Son domaine d'expression dans la région ventrale du tube neural est contenu dans le domaine *Nkx2.2*⁺ (Sommer *et al.*, 1996b; Cau *et al.*, 1997; Ravassard *et al.*, 1997d; Lee *et al.*, 2003). En l'absence de NGN3, l'expression de NKX2.2 et de SIM1 (marqueur des inter-neurons V3) est perturbée, tandis que les marqueurs des motoneurons *Islet1* ne sont pas modulés. La variation du territoire de NKX2.2 et de SIM1 ne peut pas s'expliquer par une augmentation de la proportion de mort cellulaire. En revanche, l'expression des marqueurs du lignage glial est réduite et retardée (MBP, PLP, et GFAP). *In vitro* dans des fibroblastes, la protéine NGN3 est capable de diriger l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle des séquences promotrices de PLP, mais pas des séquences promotrices de la GFAP dans des fibroblastes. Ces résultats suggèrent peut être un rôle de NGN3 dans la différenciation des précurseurs gliaux en oligodendrocytes.

3.2.6 Conservation de la fonction proneurale entre la drosophile et les vertébrés : conclusion

L'expression des gènes proneuraux dans les progéniteurs neuraux individuels est transitoire. La recherche de similitudes et la comparaison entre les modèles de drosophile et de vertébrés permettent d'avancer dans la compréhension des premières étapes qui engagent progressivement et définitivement une cellule vers une destinée neuronale. En effet, les gènes proneuraux sont nécessaires pour la sélection des progéniteurs neuraux (détermination) et

influencent leur engagement dans la voie de différenciation neurale dépendante de la signalisation Notch (inhibition latérale).

Cependant, il existe des différences importantes concernant le contexte cellulaire dans lequel agissent ces gènes proneuraux, ainsi que dans les types de décision qu'ils engagent.

Chez la drosophile, les gènes proneuraux sont d'abord exprimés par les cellules ectodermales quiescentes, qui possèdent encore le double potentiel de devenir des épidermoblastes ou des neuroblastes. C'est donc l'activité des gènes proneuraux qui a comme conséquence la sélection des progéniteurs du lignage neural. Ces cellules demeurent multipotentes puisqu'elles sont capables de devenir des neurones ou des cellules gliales. Dans le SNP, elles ont aussi le potentiel de produire d'autres types cellulaires non neuronaux. C'est seulement après diminution de l'expression des gènes proneuraux que les progéniteurs déterminés commencent à se diviser.

Chez les vertébrés, les gènes proneuraux sont exprimés par les cellules neuroépithéliales qui sont déjà orientées vers une destinée neurale, c'est à dire déjà spécifiées. Cependant, ces cellules conservent les propriétés d'auto-renouvellement des cellules souches et prolifèrent dans une certaine mesure avant de se différencier.

La résultante de l'activité proneurale dans ces cellules est la genèse de progéniteurs que l'on pourrait qualifier d'intermédiaires, qui se limitent à un destin neural (neuronal ou glial) lorsqu'ils quittent le neuroépithélium. Contrairement aux progéniteurs neuraux drosophiliens, chez les vertébrés, ces cellules ont un potentiel mitotique limité (capacité d'auto-renouvellement perdue). Ainsi, il ne s'agit plus de cellules souches mais plutôt de précurseurs multipotents qui subissent progressivement une restriction de leurs potentialités développementales, aboutissant, par étapes successives, à la formation des précurseurs déterminés qui effectueront à leur tour les étapes de différenciation proprement dites.

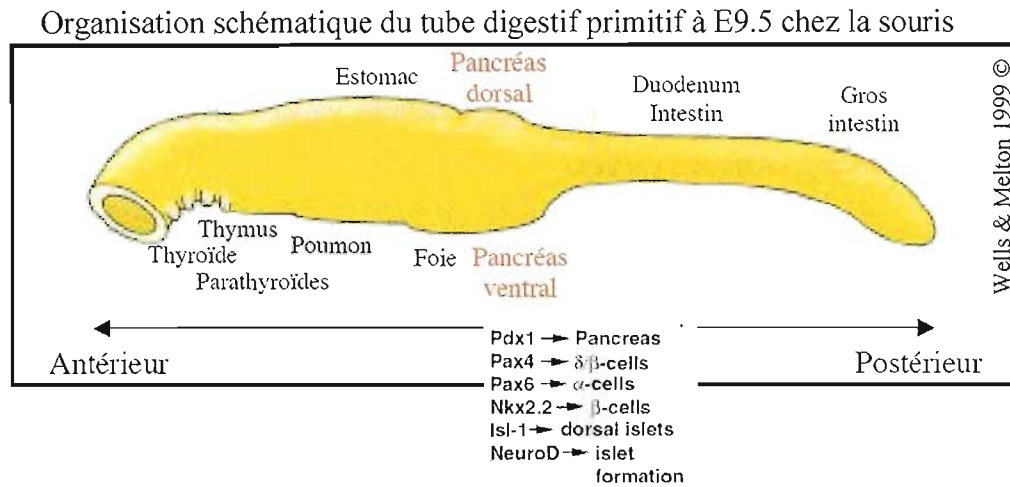
4 Développement du système digestif

Le développement du tube digestif primitif à l'origine de l'épithélium gastro-intestinal ainsi que de celui des glandes digestives annexes, telles que le pancréas, se déroule principalement en quatre étapes, similaires dans leur principe général aux grandes étapes de la neurogenèse comme proposée par (Wilson et Edlund, 2001)(§4).

Initialement, les cellules endodermales destinées à la formation du tube digestif primitif doivent acquérir la **COMPETENCE** à participer au développement des territoires présomptifs du tractus digestif. Cette étape d'acquisition de compétence est médiée par la combinaison de signaux appropriés et est suivie par l'étape de **SPECIFICATION** au cours de laquelle, les cellules multipotentes compétentes s'orientent vers la voie de production des progéniteurs épithéliaux sans restriction de leur potentiel de différenciation. La confirmation de cet engagement a lieu au cours de l'étape de **DETERMINATION**. Dans le cas du développement du pancréas, les cellules sont alors engagées à devenir les constituants de l'épithélium pancréatique et se déterminent dans la voie endocrine ou exocrine. Enfin, l'étape de **DIFFERENCIATION** parachève le processus. La cellule précurseur subit un nombre limité de divisions puis reçoit l'ordre de sortir du cycle mitotique, et commence à exprimer les gènes caractéristiques d'une cellule spécialisée de la voie endocrine ou exocrine.

4.1 Organisation du tube digestif primitif

Le tube digestif primitif s'organise à partir de l'endoderme (feuillet germinatif le plus interne de la gastrula) à la suite de la gastrulation des vertébrés et se présente comme un tube rectiligne, constitué d'un épithélium de surface doublé extérieurement par du mésenchyme correspondant à la splanchnopleure (feuillet profond du mésoderme latéral). Il est fermé dorsalement ainsi qu'aux extrémités antéropostérieures et par des régions qui sont restées didermiques à la fin de la gastrulation. En revanche, sa face ventrale présente deux ouvertures l'une communiquant à son extrémité postérieure avec l'allantoïde, l'autre avec le lécithocèle dans sa partie moyenne.



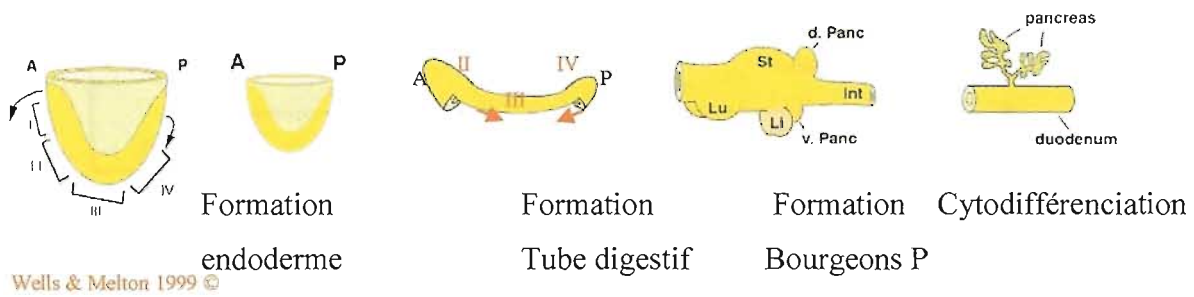
Les modifications de courbure subies par l'embryon, et notamment la plicature caudale, rapprochent les deux bords de l'intestin médian aboutissant à l'individualisation du tube digestif ventral et la formation de la vésicule vitelline.

A E7.5 chez la souris, l'endoderme du tube digestif primitif semble morphologiquement homogène. Cependant, un gradient entre les premières cellules endodermique sortant de la ligne primitive, regroupées du côté antérieur de l'embryon, et les cellules migrant plus tardivement participe à la mise en place d'une **régionalisation** antéropostérieure. Les cellules migrant plus tardivement participeront à la formation de l'endoderme postérieur (Thomas et al 1996). Ce différentiel est déjà visible au niveau de la spécificité d'expression de marqueurs génétiques tout au long de ce tube. Il participe à la formation des différents tissus et glandes que l'on trouve en place chez l'adulte.

Cet axe antéropostérieur du tube digestif primitif se définit par la nature des signaux émis par les précurseurs : de la notochorde antérieurement, du mésoderme latéral et de la ligne primitive dorsalement (Wells et Melton, 1999), (Wells et Melton, 2000).

Il en résulte un découpage de l'endoderme précoce, puis du tube digestif primitif en quatre territoires présomptifs (régions **I** à **IV**) représentés sur la figure ci-dessous.

L'endoderme donne naissance à des organes aux fonctions variées. L'intestin primitif qui en découle peut se découper en quatre parties.



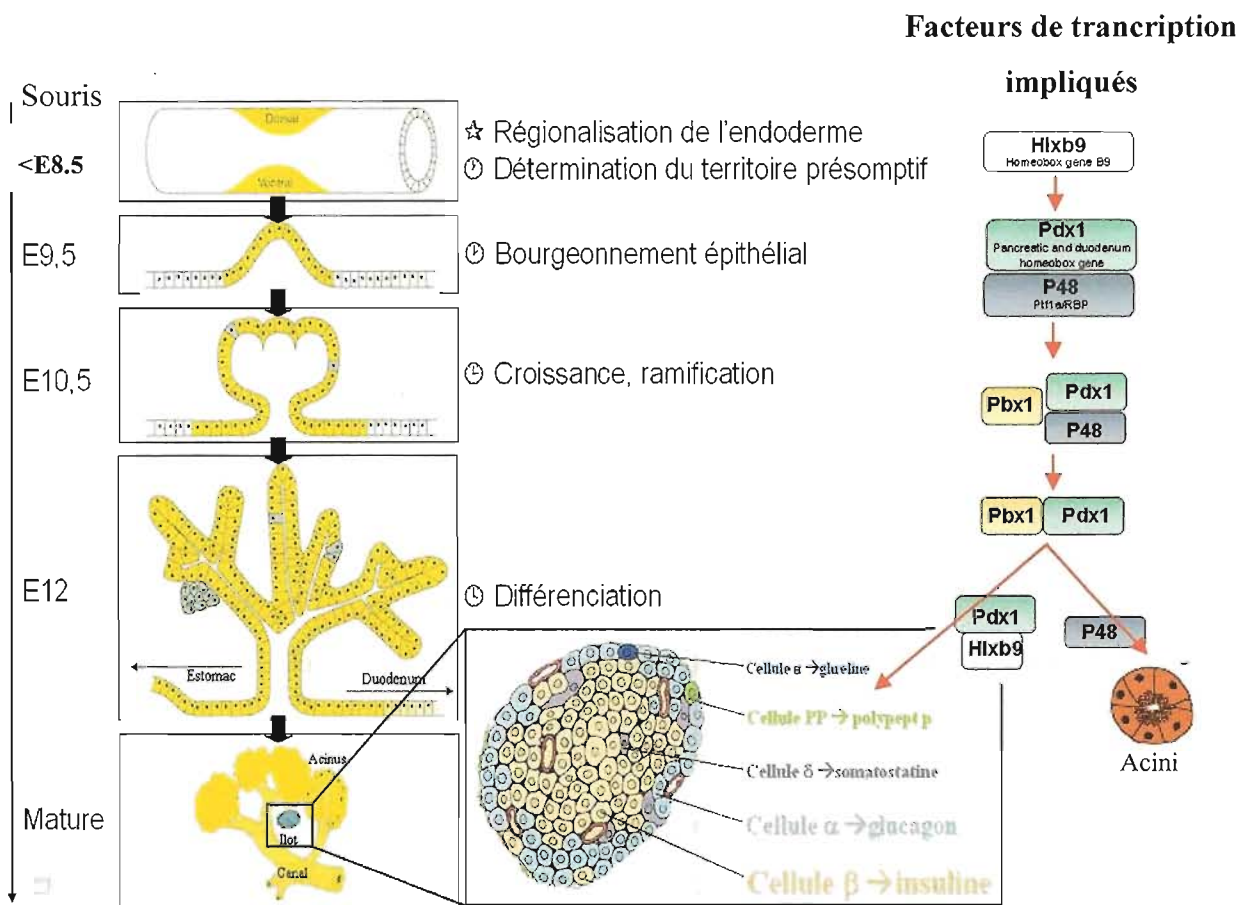
- L'intestin primitif antérieur (**I**), adjacent au cœur, s'étend de la membrane pharyngienne, qui donnera aussi naissance à l'œsophage, aux poumons, aux amygdales, au thymus, à la thyroïde, aux parathyroïdes, jusqu'aux diverticules hépatiques qui une fois ramifiés donneront l'épithélium glandulaire du foie.
- L'intestin primitif médian est adjacent à la notochorde et aux somites. A l'interface entre I et II se formeront les bourgeons pancréatiques et l'estomac (**II** et **III**), suivis du duodénum et du petit intestin (**III**).
- L'intestin primitif dorsal participera à la formation du gros intestin et de l'anus (**IV**).

Cette organisation se précise entre E8.5 et E12.5, en particulier sous l'influence de facteurs paracrines (SHH, acide rétinoïque, FGF, BMP, WNT), et est contrôlée par des combinaisons région-spécifiques de déterminants génétiques codés par des homéogènes : *Hox*, *parahox*, *Pax* et *Nkx* qui présentent des profils d'expression segmentés. (Wells et Melton, 1999; Grapin-Botton *et al.*, 2001).

Le territoire présomptif pancréatique se spécialise dans la partie médiane de l'endoderme dans un domaine du Tube digestif primitif exprimant une combinaison précise de ces déterminants génétiques comme illustré ci-dessus. Dès lors, l'organogenèse pancréatique se déroule sous le contrôle d'un relai de signaux permissifs et/ou instructifs (Wells et Melton, 2000; Dessimoz *et al.*, 2006).

4.1.1 Organogenèse de l'épithélium pancréatique

4.1.1.1 Formation des ébauches pancréatiques



D'après Kim et MacDonald 2002; Wells 2003

La description du développement embryonnaire du pancréas est majoritairement illustrée chez les rongeurs [souris/rat] (Pictet *et al.*, 1972; Wells et Melton, 1999; Edlund, 2002; Kemp *et al.*, 2003; Habener *et al.*, 2005) (Kim et MacDonald, 2002), (Wells, 2003) et dans le cadre médical chez l'embryon et le fœtus humain (Moore *et al.*, 1995; Hill et Duvillie, 2000; Polak *et al.*, 2000; Castaing *et al.*, 2001).

Chez la souris, le futur territoire pancréatique est déjà spécifié à 8 jours de développement embryonnaire (stade E8/8.5 chez le rat -Carnegie 8- 13 somites) au niveau de la région à proximité du territoire présomptif duodénal. A ce stade, la notochorde est en contact étroit avec la face dorsale de l'intestin primitif au niveau du territoire présomptif du futur pancréas. Les facteurs solubles (signaux permissifs) synthétisés par la chorde induisent la détermination de la région pancréatique. Au stade E9.5 (E10.5 chez le rat -Carnegie 9/10- 20 somites), une entité séparée, le bourgeon pancréatique dorsal émerge à partir de l'intestin primitif proche du futur territoire stomacal (Pictet *et al.*, 1972). Il n'est alors constitué que d'une monocouche épithéliale entourée de mésenchyme. Ce bourgeonnement est vraisemblablement dû à des divisions radiales des cellules de l'épithélium intestinal. À ce stade, la chorde est alors séparée de l'endoderme par la fusion des aortes dorsales. Deux nouvelles évaginations ventro-latérales faisant face aux structures hépatiques apparaissent 12 à 24 heures plus tard à E10.5 chez la souris (E11.5 chez le rat -Carnegie 11/13- 28 à 30 somites). Ces bourgeons ne sont pas dans le même contexte tissulaire que le bourgeon dorsal. En effet, ils se trouvent au contact du mésoderme splanchnique et des cellules endothéliales mais éloignés de la notochorde.

Dans certaines espèces, dont la souris et l'homme, seul un des deux bourgeons pancréatiques ventraux continuera son développement au détriment du second qui involuera (Lammert *et al.*, 2001). Les deux bourgeons pancréatiques restant (dorsal et ventral) vont simultanément proliférer et se ramifier (Branching) dans le mésenchyme adjacent. Il est intéressant de noter que leur développement se poursuit parallèlement tout en étant sous l'influence de signaux différents (Deutsch *et al.*, 2001; Kumar et Melton, 2003; Martin *et al.*, 2005) et au contact de tissus inducteurs différents comme par exemple l'aorte dorsale, les veines vitellines et mésenchyme (voir §4.1.1.4).

Une rotation de l'axe estomac-duodénum met en contact les deux bourgeons qui fusionnent (E15 souris-E16/17 chez le rat – Carnegie 21) pour former le rudiment pancréatique, au sein duquel les différents lignages cellulaires se différencieront et s'organiseront progressivement (Pictet *et al.*, 1972; Slack, 1995; Edlund, 2002; Kemp *et al.*, 2003; Kumar et Melton, 2003). Chacun des bourgeons gardera malgré tout son propre canal (canal de Wirsung et canal de Santorini) par lesquels les enzymes digestives sont sécrétées dans la lumière intestinale, seul reliquat de l'origine double du pancréas. Dans le même temps (E16), la vascularisation du tissu pancréatique se met en place.

Les phases ultérieures de maturation se consacrent à maintenir un équilibre entre prolifération et différenciation, contrôlant ainsi la taille du tissu.

Chez l'homme, peu de données sont accessibles sur le développement précoce de l'épithélium pancréatique. L'apparition du pancréas a lieu au cours de la 4^{ème} semaine de développement embryonnaire. Entre la 4^{ème} et la 6^{ème} semaine de gestation, le pancréas, le foie, la vésicule biliaire ainsi que leur système de canaux se développent à partir de diverticules endoblastiques qui bourgeonnent du duodénum dans le mésenchyme environnant. Les deux bourgeons se développent de façon indépendante en un système de tubules ramifiés jusqu'à la septième semaine de gestation. Au cours de la cinquième semaine de gestation, le bourgeon pancréatique ventral migre postérieurement autour de l'axe du duodénum et fusionne avec le bourgeon dorsal pour donner le pancréas définitif (Moore *et al.*, 1995). Le canal principal du bourgeon ventral deviendra, finalement, le canal pancréatique principal (canal de Wirsung) qui draine les sécrétions pancréatiques dans le duodénum. Le second (canal de Santorini) s'anastomose et le rudiment restant fusionne avec le principal dans 90% des cas.

4.1.1.2 Ontogenèse et différenciation terminale

Le pancréas fonctionnel se compose de trois types principaux de cellules (en plus des cellules stromales et vasculaires) qui se différencient à partir de progéniteurs contenus dans l'épithélium :

- ❖ les cellules endocrines (îlots de Langerhans), à libération hormonale régulant principalement l'homéostasie du glucose, qui représentent 1 à 2% de la masse pancréatique,
- ❖ les cellules acinaires, à sécrétion externe qui produisent les enzymes digestives,
- ❖ les cellules ductales (cellules des canaux pancréatiques). Ces cellules sont générées séquentiellement au cours du développement. Les cellules β matures (sécrétant l'insuline), acinaires et ductales sont visibles à partir de E13 chez la souris (soit E15 chez le rat), tandis que d'autres cellules exprimant des marqueurs de différenciation endocrines, cellules α , apparaissent très précocement dès E10. Ces dernières sont isolées dans le tissu peu différencié et co-expriment souvent l'insuline et le glucagon. Les structures types d'un pancréas fonctionnel regroupant les cellules endocrines en îlots ne sont observées qu'à partir de la fin de la gestation vers E19 (Slack, 1995).

L'ontogenèse des cellules à insuline et glucagon se déroule en trois phases majeures (dites transitions primaires à tertiaires) (Pictet *et al.*, 1972; Habener *et al.*, 2005), au cours desquelles l'activité de prolifération et l'activité différenciation varient. Initialement l'état des cellules est appelé prédifférencié.

Chez le rat, une première phase de transition (primaire) débute de manière concomitante avec l'émergence des bourgeons épithéliaux vers E10. Elle marque la détection des premières hormones endocrines du pancréas. Au terme de cette première vague de développement de cellules endocrines, le pancréas comporte de nombreuses cellules dans un état proto-différencié, à savoir des populations de cellules isolées exprimant le marqueur glucagon seul ou co-exprimant aussi l'insuline. Cette période ontogénique correspond, d'un point de vue organogénétique, à l'accumulation de cellules du mésenchyme autour du bourgeon épithélial indifférencié. L'expression précoce du glucagon, versus les autres marqueurs endocrines, suggérait une fonction progénitrice des cellules à glucagon dans le lignage endocrine. Cette hypothèse a été invalidée par l'expression spécifique de la toxine diphtérique A dans les différentes sous-populations endocrines, ce qui indique un lignage distinct entre cellules α et β (Herrera *et al.*, 1994). L'utilisation du système CRE-lox a permis d'établir que les cellules doublement positives co-exprimant à la fois l'insuline et le glucagon ne sont pas à l'origine des cellules β matures. Inversement, les cellules α matures n'expriment pas temporairement l'insuline. En revanche, l'utilisation de souris *pdx1*-déletrice (promoteur *pdx1* dirigeant la recombinaison Cre) a permis d'établir une origine $PDX1^+$ commune à tous les précurseurs endocrines pancréatiques (Herrera, 2000).

La transition secondaire prend place vers le 15^e jour de développement embryonnaire. La prolifération de cellules immatures et la différenciation (100 fois plus pour les cellules β et 1000 fois pour le tissu exocrine) y sont particulièrement importantes (Han *et al.*, 1986). Les cellules expriment de façon stable l'une ou l'autre des hormones contrôlant l'homéostasie glucidique. Au niveau tissulaire, cette phase correspond à la croissance, à l'arborisation de l'épithélium et à la formation des structures acinaires.

Une dernière phase se déroule à partir de E15, se termine juste avant la naissance et se voit perturbée par la rotation stomacale et la fusion des bourgeons. C'est après ce dernier remaniement que les cellules isolées se condensent en îlot de Langerhans (transition tertiaire). Cette dernière phase consiste en la maturation des cellules endocrines et l'acquisition de la réponse nutriment-dépendante. Elle s'étend jusqu'à 2-3 semaines après la naissance. A terme, le pancréas adopte alors une morphologie définitive quelques semaines après la naissance. Les cellules qui le composent sont différenciées et participent à la régulation du taux de glucose plasmatique. Cependant, cette vision du pancréas adulte n'est pas figée. En effet, un équilibre relatif existe entre les processus prolifératifs, neurogéniques et apoptotiques qui sont déterminants pour le maintien de la masse de cellules endocrines et plus particulièrement des cellules β .

Le **Tableau 9** résume l'ordre d'apparition des premières cellules exprimant de façon spécifique ARNm et protéines des hormones endocrines et enzymes pancréatiques chez le rongeur.

Les études d'immuno-histochimie menées sur des tissus humains ont permis de montrer que l'insuline apparaissait vers la 8^{ème} semaine de gestation, suivie par le glucagon à la 10^{ème} semaine (Polak *et al.*, 2000).

4.1.1.3 Différenciation terminale et morphogenèse

Le pancréas adulte est une glande bi-fonctionnelle essentielle à la digestion et à l'homéostasie du glucose. Il possède une fonction exocrine inhérente aux cellules acinaires, impliquées dans la synthèse et la sécrétion d'enzymes digestives (amylase, elastase, protéase, nucléase....) qui constituent le suc pancréatique. Il représente environ 98% de la masse pancréatique. Ces cellules se regroupent en acini facilement reconnaissables grâce à la présence de grains de sécrétion ou zymogènes.

Les cellules dites canalaire ou ductales tapissent une structure en canicules ramifiées, se regroupant pour former le canal pancréatique principal. Ce système draine les enzymes digestives produites par les acini vers la lumière du duodénum.

La seconde fonction, dite endocrine, est responsable de la synthèse et de la libération par voie sanguine d'hormones assurant la régulation de l'utilisation du glucose par les tissus. La particularité des cellules endocrines est de former des îlots cellulaires fonctionnels, ou îlots de Langerhans, organisés en fonction de chaque type cellulaire. Ces unités fonctionnelles endocrines sont disséminées dans le pancréas exocrine et sont constituées de 5 types cellulaires : les cellules α , β , δ , ϵ et PP.

Lors des phases embryonnaires tardives, s'opère une dernière maturation du tissu lui-même, qui ordonne l'ensemble des cellules qui le compose. Il s'agit de la phase de morphogenèse/organogenèse. Initialement, les cellules endocrines se forment dans la partie distale des bourgeons épithéliaux ramifiés du pancréas et quittent l'épithélium à E16,5. Elles migrent dans le mésenchyme et s'agrègent pour former les nombreux îlots de Langerhans qui ne représentent qu'1/100^{ème} de la masse pancréatique. Des expériences de chimères d'agrégation chez la souris ont montré que les îlots semblent d'origine polyclonale (Deltour *et al.*, 1991). Ces mécanismes de regroupements hiérarchisés par rapport à leur fonction sont dépendants des molécules d'adhérence (intégrines $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$; E-, N- et R- cadhérines ;

CAM/Cell Adhesion Molecules) (Cirulli *et al.*, 2000; Esni *et al.*, 2001; Kim et Hebrok, 2001), de la capacité des cellules à digérer la matrice extracellulaire (métalloprotéases pancréatiques MMP-2 et -9) et sont sous le contrôle de voies de transduction telles que celle de l'EGF et peut-être celles des membres de la famille du TGF β (Miralles *et al.*, 1998a; Cirulli *et al.*, 2000; Esni *et al.*, 2001; Kim et Hebrok, 2001). Par exemple, les îlots de souris dont la voie de signalisation de l'EGF est invalidée restent à proximité des canaux (Miettinen *et al.*, 2000). Il a été supposé pendant un temps que les îlots avaient une origine clonale et que toutes les cellules qui les composaient, dériveraient d'un seul et même précurseur. Ces hypothèses furent infirmées en 1991 lorsque Deltour utilisa des chimères de souris, produites par agrégation de morula, où l'origine des cellules β pouvait être clairement identifiée sur des critères histologiques. Dans deux des animaux ainsi obtenus, les îlots étaient composés de populations mixtes, montrant ainsi que les cellules d'un même îlot peuvent provenir de l'un ou l'autre des deux embryons constituant la chimère (Deltour *et al.*, 1991). En 1999, Percival réassocia en culture des cellules épithéliales sauvages et ROSA-26 dans un mésenchyme sauvage. Les îlots et les acini résultant de cette culture étant de composition mixte, il en conclut qu'aucun des types cellulaires correspondant ne résultait d'une origine clonale. Ni les îlots, ni les acini ne dérivent de la multiplication d'une seule et même cellule (Percival et Slack, 1999).

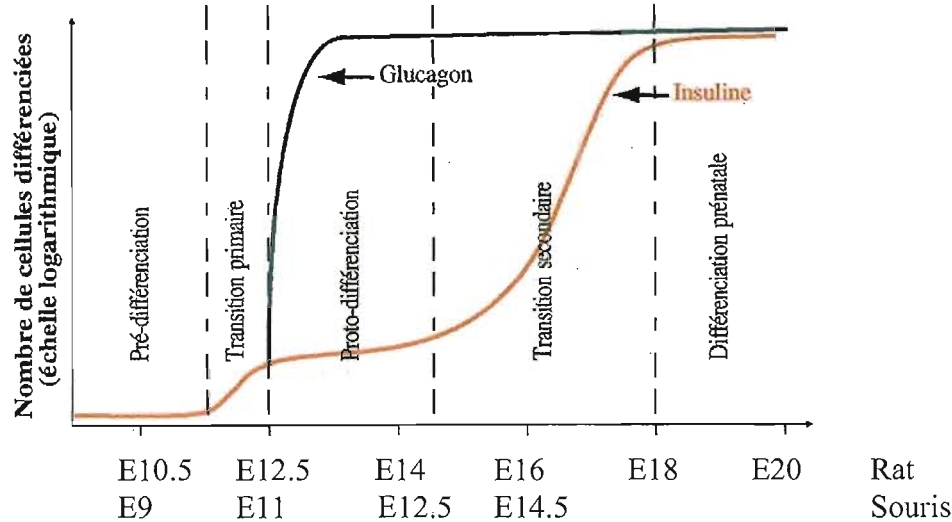
4.1.1.4 Signaux permissifs instruisant le développement des bourgeons pancréatiques

La mise en place et le développement de l'épithélium pancréatique se fait sous l'instruction de signaux permissifs et/ou instructifs qui se relaient et proviennent :

- ❖ Précocement l'ectoderme et du mésoderme (Wells et Melton, 2000),
- ❖ de la notochorde pour le bourgeon dorsal (Wessels et Cohen, 1967; Kim *et al.*, 1997; Hebrok *et al.*, 1998; Edlund, 2002),
- ❖ l'endothélium vasculaire aortique dorsalement et les veines vitellines ventralement (Lammert *et al.*, 2001; Edlund, 2002; Jacquemin *et al.*, 2006)
- ❖ le mésoderme cardiaque limite l'expansion du bourgeon pancréatique ventral (Kumar et Melton, 2003),
- ❖ L'influence du mésenchyme pancréatique sur le développement de l'ébauche dorsal est bien renseignée (Golosow et Grobstein, 1962; Gittes *et al.*, 1996; Miralles *et al.*, 1998b; Wells et Melton, 1999; Edlund, 2002; Kemp *et al.*, 2003; Duvillie *et al.*, 2006).

La détermination du territoire présomptif pancréatique résulte de trois étapes successives. La régionalisation de l'endoderme est amenée par des signaux du mésoderme antérieur dont les

A



B

Stades embryonnaires	Ontogenèse (Phase/transition)	Hormones exprimées
<i>[E8,5]</i>		<i>ARNm somatostatine</i>
E9,5	1ere vague Prédifférenciation	Co-expression Glucagon/PP, peptide YY, polypeptide pancréatique, neuropeptide Y
<i>[E9,5]</i>		<i>ARNm Glucagon & insuline</i>
E10-E10,5	Prédifférenciation	Co-expression glucagon/insuline et cellules à glucagon ou à sécrétions PP seules
<i>[E10,5]</i>		<i>ARNm PP</i>
E11-E12	Transition Primaire	Différenciation accrue de cellules à glucagon
<i>[E12,5]</i>		<i>ARNm amylase</i>
E14	protodifférenciation	Somatostatine
E15	Transition secondaire	Différenciation accrue de cellules à insuline <i>Amylase</i>

[En rouge] sont représentés les Stades auxquels les ARNm des enzymes et hormones ont été détectées

Tableau 9 Ordonnancement d'apparition des différentes hormones pancréatiques

A- Le graphique ci-dessus représente les différentes phases de différenciation hormonale (insuline et glucagon) au cours des transitions primaire (E10-E12 chez la souris) et secondaire (E15-E12), déterminées d'après Pictet (1972). Les stades embryonnaires reportés dessous correspondent à ceux du développement pancréatique du rat et de la souris respectivement (selon Slack, 1995).

B- L'ordre temporel précis de l'expression des hormones et enzymes pendant le développement pancréatique demeure quelque peu controversé; le tableau représente un consensus basé sur l'examen immunocytochimique du pancréas de souris pendant le développement embryonnaire. La différenciation terminale des différents types cellulaires du pancréas est en général caractérisée par l'expression de marqueurs liés à la fonction de ces cellules.

La limite évidente de ce type d'étude est qu'elle ne tient pas compte d'un aspect fonctionnel des hormones ou enzymes sécrétées, il serait donc erroné de parler de cellules α , β , δ , PP. Cette nomenclature étant réservée aux cellules différenciées terminales fonctionnelles.

différents territoires se subdivisent en fonction de l'expression d'homéogènes. Les signaux de la notochorde, en contact direct avec l'endoderme, induisent la prédétermination du territoire présomptif pancréatique. Finalement, l'endothélium vasculaire vient prendre le relais et induit la détermination du pancréas primitif alors que le mésoderme cardiaque en limite l'expansion. Les interactions entre épithélium et mésenchyme sont cruciales pour le contrôle de l'équilibre entre prolifération et différenciation.

4.1.2 Organogenèse intestinale

Chez le rat, les principaux événements morphogénétiques ont lieu pendant la dernière semaine de gestation. Jusqu'au 14^{ème} jour de vie fœtale, l'intestin est constitué d'un tube formé de deux couches concentriques : l'une externe, le mésenchyme ; l'autre endodermale, bordant la lumière du tractus digestif et les glandes associées. Les premiers signes de différenciation du mésenchyme apparaissent au 15^{ème} jour de vie fœtale, sont visibles avec la mise en place des cellules de la *lamina propria* et celle responsable du péristaltisme. Les villosités s'évaginent de l'épithélium à partir de E17 chez la souris (10^{ème} semaine chez l'homme) et sont constituées de cellules différenciées. Pendant les deux premières semaines de la vie post-natale, ces transformations s'accompagnent de la mise en place des cryptes à la base des villosités par invagination épithéliale. Les cryptes contiennent les cellules souches, les cellules à fort taux prolifératif et les cellules de Paneth (différenciées). C'est à la jonction cryptovillositaire que se fait la transition de différenciation des cellules proliférantes en provenance des cryptes. Par exemple, les cellules à Goblet et les cellules entéro-endocrines migrent vers l'apex de la villosité pour terminer un cycle de renouvellement (de 3 à 4 jours), tandis que les cellules de Paneth migrent vers le bas de la crypte et se renouvellent plus lentement. Ces renouvellements cellulaires sont permanents et réguliers tout au long de la vie de l'individu.

L'épithélium intestinal se caractérise par un ensemble de populations cellulaires hétérogènes différenciées à partir de progéniteurs communs localisés dans les cryptes intestinales (Cheng et Leblond, 1974).

- ❖ La grande majorité, non endocrine [90%], est constituée des entérocytes dans l'intestin, qui expriment la phosphatase alcaline intestinale (IAP) et de colonocytes, qui postérieurement n'expriment pas d'hydrolases digestives, des cellules de Paneth, concentrées essentiellement au fond des cryptes du duodénum jusqu'à l'iléon, des cellules à mucus ou cellules à Goblet, ainsi que les cellules calciformes dont la proportion augmente au niveau du colon (Yang *et al.*, 2001; Schonhoff *et al.*, 2005).

- ❖ En revanche, les hormones sont sécrétées par les cellules entéro-endocriniennes qui ne représentent qu'une faible proportion (environ 1%).

Il est intéressant de souligner trois caractéristiques du système endocrinien intestinal:

- ❖ une originalité structurelle, puisque les cellules qui le composent sont disséminées dans l'épithélium gastro-intestinal, on parle de système endocrine diffus ou SED (Hocker et Wiedenmann, 1998). Contrairement à la situation insulaire adoptée par l'épithélium pancréatique, le système endocrine intestinal ne subit pas de remaniement morphogénétique aboutissant à la formation de foyer de cellules endocrines. Ainsi, l'originalité du système endocrinien gastro-intestinal révèle une dispersion des cellules endocrines le long du tractus digestif.
- ❖ une remarquable diversité de produits sécrétés (hormones et enzymes), qui possèdent une fonction particulière dans le contrôle des fonctions digestives. Sur la base de leur contenu hormonal se décomptent au moins 15 sous-populations différentes,
- ❖ enfin il existe une répartition géographique des sous-populations par secteur organisés le long de l'axe antéropostérieur du tube digestif (Hocker et Wiedenmann, 1998).

Il existe de nombreuses concordances entre l'organogenèse du tube digestif et celle des glandes annexes associées.

Le premier point concerne l'origine endodermique conjointe des cellules épithéliales du tube digestif et du pancréas par exemple (Fontaine *et al.*, 1977; Le Douarin, 1988).

Un second aspect concerne la conservation de combinaison de facteurs de transcription communs dont les gènes homéotiques. Tout comme le développement du pancréas, les contacts entre cellules épithéliales et mésenchymateuses sont indispensables à la morphogenèse et à la cytodifférenciation du tractus intestinal. Il semble que la régionalisation hétérogène de cellules spécialisées le long du tractus soit inhérente à la nature des signaux mésenchymateux. En effet, des expériences de co-cultures d'épithélium intestinal en présence de différents tronçons du mésenchyme instruisent cette régionalisation (Rawdon *et al.*, 1984; Rawdon et Andrew, 1988; Andrew et Rawdon, 1990). Lors des événements morphologiques les plus importants tels que la formation des villosités, la lame basale sous-épithéliale devient discontinue, permettant ainsi les contacts entre les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses sous-jacentes.

La répartition de ces cellules endocrines se trouve sectorisée le long de l'axe antéropostérieur. Cette régionalisation est caractérisée par des facteurs morphogènes différents le long de l'axe ainsi que par une spécificité fonctionnelle (digestion et absorption).

4.2 Cascade moléculaire et lignage cellulaire endocrine, rôle central de NGN3

Au niveau du pancréas, la cascade d'évènements moléculaires aboutissant à la différenciation terminale de chacune des sous-populations qui compose ce tissu fait l'objet de nombreux travaux (**Figure 13**). Succinctement, les gènes codant les différents facteurs de transcription impliqués dans le développement du pancréas peuvent être classés en trois catégories, selon qu'ils interviennent dans la:

- ❖ formation des précurseurs pancréatiques à partir de l'endoderme intestinal,
- ❖ formation des cellules endocrines à partir des précurseurs pancréatiques,
- ❖ différenciation terminale des cellules endocrines en cellules endocrines β .

Afin d'éviter de donner au paragraphe qui va suivre un aspect de catalogue fastidieux des différents éléments/marqueurs du lignage pancréatique, nous limiterons leur présentation à l'un d'entre eux NGN3.

Il constitue le marqueur le plus précoce des progéniteurs endocrines pancréatiques. Sa fonction de spécification du lignage endocrine a été mise en évidence par l'analyse d'un modèle de souris invalidé pour ce gène. Son invalidation provoque l'absence totale de tous les lignages endocrines du pancréas, tandis que sa surexpression induit l'activation précoce de la différenciation endocrine (Alpelqvist *et al.*, 1999), (Gradwohl *et al.*, 2000). L'absence chez le mutant de marqueurs intermédiaires permettant d'aboutir à des cellules endocrines matures (tels que ISL1, PAX4, PAX6, ou NEUROD) place la fonction de NGN3 au niveau de la détermination des cellules endocrines. Lorsque son expression est induite précocement dans le lignage PDX1⁺ dans des modèles de souris transgéniques exprimant NGN3 sous le contrôle du promoteur de *Pdx1*, il est capable à lui seul d'induire une hyperplasie endocrine. Ces phénotypes d'hyperplasiques et d'aplasiques respectivement dans les modèles de gain (GOF) et de perte (LOF) de fonction, rappellent fortement la fonction des gènes proneuraux dans le système nerveux ce qui lui a valu par mimétisme le terme de facteur proendocrine.

Au niveau de l'épithélium intestinal:

L'ARNm de *Ngn3* est exprimé dès E12.5 chez la souris, et se restreint chez l'adulte aux cellules immatures localisées dans les cryptes intestinales et dans l'estomac glandulaire (Jenny *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Il semble impliqué dans le développement de tous les types

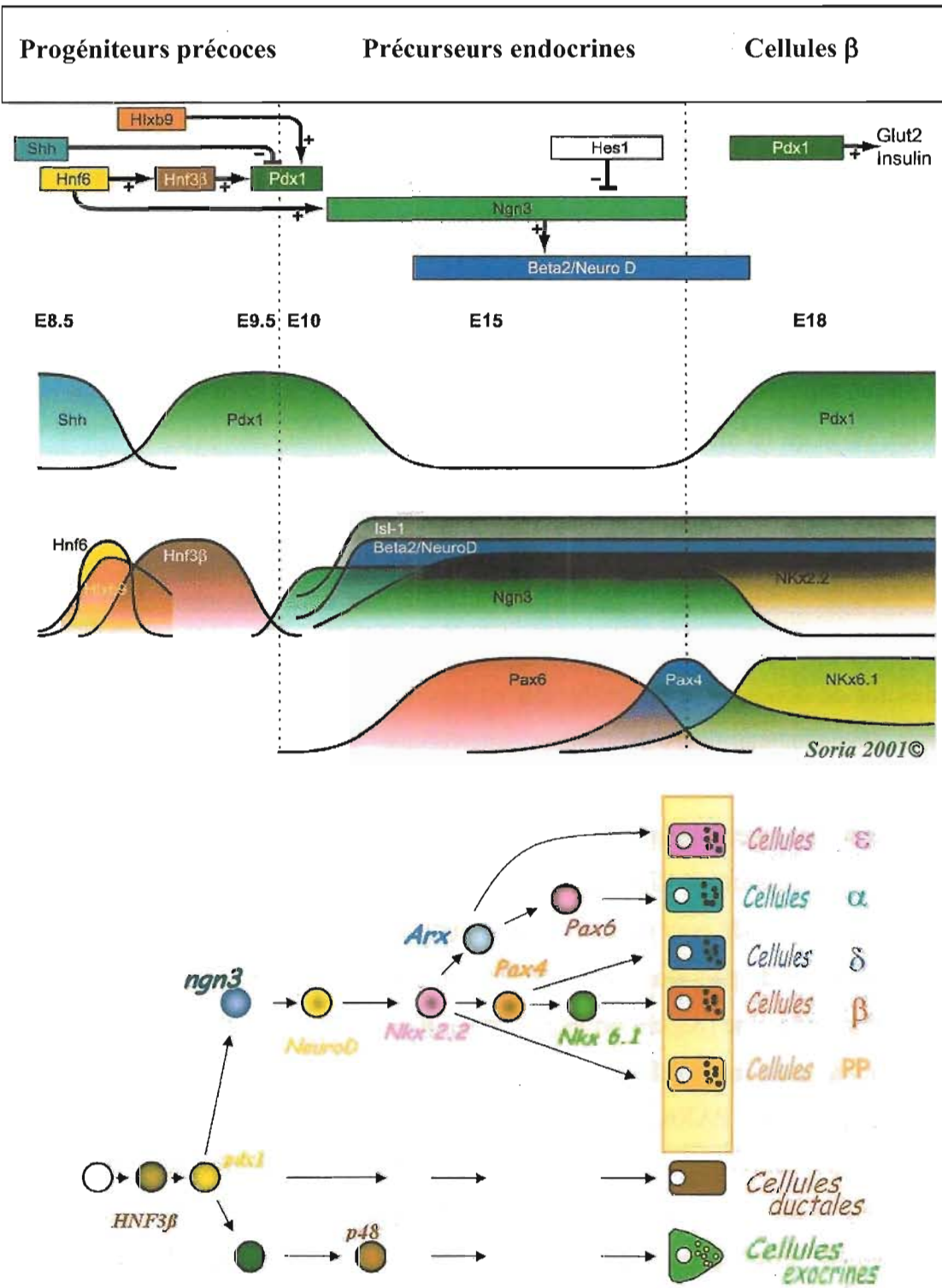


Figure 13 Cascade d'expression des facteurs de transcription au cours du développement du pancréas chez la souris (D'après Soria 2001)

A- Profils d'expression des facteurs de transcription au cours de développement pancréatique.

B- Schématisation du lignage endocrine issu de la population $ngn3^+$

cellulaires endocrines de l'intestin. En effet, en raison de l'absence de cellules endocriniennes intestinales les souris homozygotes $Ngn3^{-/-}$ ne produisent pas de somatostatine, de cholecystokinine [CCK], de sécrétine, de gastrine, de sérotonine, ni le peptide YY [PYY], le GLP [glucagon like protein] ou encore la protéine inhibitrice gastrique [GIP]. Cette déplétion est spécifiquement dirigée contre les progéniteurs des cellules endocrines, les autres types cellulaires intestinaux ne semblent pas affectés (Jenny *et al.*, 2002). Cependant, l'observation du devenir des cellules qui expriment NGN3 au cours de la maturation intestinale conduisant à une histogenèse intestinale fonctionnelle (effective pendant les trois premières semaines de vie postnatale) est rendue impossible par le phénotype post-natal léthal des mutants $Ngn3^{-/-}$. L'éventualité d'une différenciation entéro-endocrine retardée chez ce mutant a été évaluée en maintenant physiologiquement un fragment intestinal d'embryon $Ngn3^{-/-}$ (E12) par greffe ectopique sous la peau de souris receveuses compétentes (nude). L'analyse du greffon après 4 semaines montre une structure vascularisée, mature, pourvue de villosités intestinales et organisée comme chez l'adulte. En revanche, par comparaison avec un greffon intestinal sauvage, le greffon, issu d'un embryon $Ngn3^{-/-}$ ne contient aucune cellule endocrinienne (chromogranin A⁻, gastrine⁻, CCK⁻, sérotonine⁻, GIP⁻, PYY⁻ et GLP⁻). Ce résultat suggère qu'au niveau intestinal, NGN3 est commun à tout le lignage entéro-endocrine.

Des approches de lignage ont donc été entreprises avec succès en utilisant des transgènes rapporteurs tel que la GFP placés dans le contexte génomique de *Ngn3* (Lee *et al.*, 2002). Cette étude de lignage a permis d'éclairer la situation au niveau stomacal. En effet, la situation semble différer dans l'estomac glandulaire des souris $Ngn3^{-/-}$, où s'effectue encore la différenciation des cellules ECL (enterochromaffin-like) sécrétrices d'histamine ou encore les cellules X/A qui libèrent la ghreline. Cependant certaines populations endocrines sont altérées chez ce mutant. En effet les cellules à chromogranine A, celles qui expriment le glucagon [cellules A], la somatostatine [cellules D] et la gastrine [cellules G] sont altérées ; le nombre de cellules EC (enterochromaffines) sécrétant la sérotonine est fortement réduit. Enfin, le marqueur iFABP [intestinal fatty acid-binding protein] est exprimé ectopiquement dans l'intestin embryonnaire des souris $Ngn3^{-/-}$ (Jenny *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002).

L'analyse de ces facteurs dans les modèle de gain et/ou de perte de fonction permet de redessiner ci-dessous, la cascade d'évènements moléculaires pour le lignage endocrine intestinal dans laquelle NGN3 se trouve positionné en amont du lignage endocrine total pour l'intestin et partiellement pour l'épithélium gastrique.

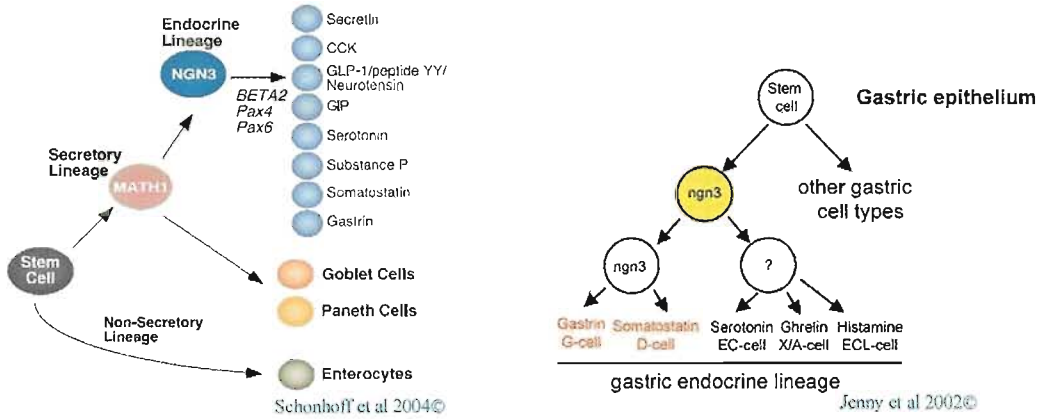


Figure 14 Lignage des cellules intestinales et gastriques
(D'après Schonhoff 2004, Jenny et al 2002).

Deux études récentes ont utilisé un fragment de 5,7kb [humain] (Lee *et al.*, 2001) et 6.9 kb [murin] (Jenny *et al.*, 2002), dont nous reparlerons au cours de la première partie de la présentation des résultats de transgénèse, afin de tracer les cellules exprimant NGN3. Ce fragment semble suffisant dans un contexte de transgénèse pour résumer le patron d'expression entéro-endocrine de l'intestin. Ces fragments ont permis de visualiser les différents sites d'expression de *Ngn3* chez l'embryon le long de l'axe proximo-distal intestinal (progéniteurs entéroendocriniens) ainsi que les sites diffus correspondant aux cryptes chez l'adulte (Jenny *et al.*, 2002). L'approche "Knock-Add-On" décrite par Mellitzer *et al.* (2004), confirme que l'expression de *Ngn3* est restreinte aux progéniteurs du lignage endocrine du tractus gastro-intestinal chez l'embryon et l'adulte. La protéine fluorescente eYFG est détectée au stade embryonnaire E15.5, tandis que chez l'adulte, après amplification du signal par immuno-fluorescence, les cellules exprimant les ARNm de *Ngn3* sont observées au niveau des cryptes et dans la partie glandulaire dans les épithéliums duodénal et stomacal, respectivement.

En résumé, NGN3 est indispensable uniquement pour le lignage endocrinien, tandis que le développement gastrique endocrinien fait appel à des mécanismes moléculaires dépendants et indépendant de NGN3 (Jenny *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Schonhoff *et al.*, 2004).

Un nouvel axe de recherche consiste à rechercher les inducteurs et les gènes cibles de neurogénine 3 afin de mieux cerner le réseau de facteurs de transcription engagés dans le développement endocrine pancréatique.

Il a été montré que les facteurs HNFs (Hepatocyte Nuclear Factor) étaient impliqués à plusieurs niveaux du développement pancréatique (Odom *et al.*, 2004). En génétique humaine la mutation des gènes *HNF1 α /TCF1*, *HNF β /TCF2* (transcription factor 1, hepatic) et *HNF4 α* est associée à des pathologies diabétiques MODY (maturity-onset of the young) de types 3, 5, 1 (Fajans *et al.*, 2001; Owen et Hattersley, 2001; Yamagata, 2003; Haumaitre *et al.*, 2006).

Parmi les membres de la famille HNF sont impliqués dans le développement du pancréas. Les modèles murins d'inactivation de ces gènes mettent en évidence une altération du développement pancréatique (Wang *et al.*, 2004), (Haumaitre *et al.*, 2005; Haumaitre *et al.*, 2006).

HNF6/ONECUT1 (one cut domain, family member 1) a clairement été décrit comme capable de stimuler directement le promoteur des gènes *Ngn3* et *Pdx1*. L'analyse du modèle de perte de fonction (KO murin) indique que la mutation de ce gène perturbe considérablement la formation des cellules α et β , sans affecter la différenciation des cellules exocrines (Jacquemin *et al.*, 2000). Récemment l'étude des séquences promotrices de *Hnf6* ont permis de mettre en évidence des éléments de régulation tels que HNF1 β , PDX1, FOXA impliqués dans les étapes précoces où sont générés les précurseurs pancréatiques (Poll *et al.*, 2006). Nous verrons que dans le cadre des perspectives de nos travaux de transgénèse, qu'il serait intéressant de tester le rôle de tels éléments cis que nous savons être présents dans les fragments génomiques que nous avons exploités. D'autres séquences consensus d'autres HNF sont aussi présentes dans les fragments que nous nous sommes proposés d'étudier.

Enfin, les cibles de NGN3 sont actuellement abordées, on connaissait le bHLH *NeuroD* (Neurogenic Differentiation, ou Beta-2)(Naya *et al.*, 1995; Naya *et al.*, 1997) comme cible directe de NGN3 dans le pancréas (Huang *et al.*, 2000a). Récemment, IIA/Insml (insulinoma-associated 1, IA-1) a été identifié comme étant une cible de NGN3 (Mellitzer *et al.*, 2006). Les premières études du patron d'expression spatio-temporel de ce facteur à doigts de zinc montrent un profil très similaire. De plus, la présence de ce facteur n'est abolie que chez le mutant *Ngn3*^{-/-}. En effet le patron d'expression de ce facteur n'est pas modifié chez les effecteurs de la cascade neurogénine 3. Il semble décrire une nouvelle voie de régulation

ngn3-dépendante. Très récemment l'invalidation du gène IA1 a été publiée et décrit l'accumulation de précurseurs endocrines immatures au détriment des populations de cellules matures dont les protéines caractéristiques de la sécrétion sont perturbées. Un fait intéressant est que ces deux points ont été observés dans le pancréas et l'épithélium intestinal des souris IA1^{-/-} (Gierl *et al.*, 2006)

Enfin, nous savons que *Ngn3* s'inscrit dans un réseau de gènes régulés par la voie d'inhibition latérale Notch dont les mécanismes sont très conservés de la drosophile aux mammifères (Apelqvist *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 2000b) comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent.

RESULTATS

RESULTATS 1

RESULTAT 1 - IDENTIFICATION DES REGIONS REGULATRICES PERMETTANT L'EXPRESSION TISSULAIRE RESTREINTE DE NEUROGENINE 3

CONTEXTE DU PROJET : ANALYSE DES REGIONS REGULATRICES DE *NGN3*

L'ARNm codant le facteur de transcription bHLH *Ngn3* a été initialement identifié à partir du SNC embryonnaire. Il est impliqué dans la détermination neurale des progéniteurs du neuroectoderme dans des régions discrètes du système nerveux (Sommer *et al.*, 1996a; Cau *et al.*, 1997; Lee, 1997; Ravassard *et al.*, 1997a; Kaestner *et al.*, 2003). Son expression dans ces territoires est restreinte chez l'embryon aux étapes précoces de la neurogenèse.

L'étude des souris dont le gène *Ngn3* a été invalidé a révélé une létalité post-natale chez les mutants homozygotes, ayant pour cause un diabète sévère, conséquence de l'absence totale de cellules endocrines pancréatiques (Gradwohl *et al.*, 2000). Ces résultats, combinés à ceux des études de gain de fonction, suggèrent que NGN3 est un acteur principal impliqué dans la destinée des cellules progénitrices multipotentes dont dérivent tous les types cellulaires endocrines du pancréas. NGN3 est encore défini comme le marqueur le plus précoce des cellules endocrines de l'épithélium pancréatique (Apelqvist *et al.*, 1999; Grapin-Botton et Melton, 2000; Guillemot, 2000; Jensen *et al.*, 2000a; Schwitzgebel *et al.*, 2000).

Plus récemment, le rôle de NGN3 a été mis en évidence dans l'étape d'engagement de la voie de différenciation entéro-endocrine dans l'épithélium intestinal au cours du développement et chez l'adulte, et dans la différenciation endocrinienne gastrique (Jenny *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Enfin, ce facteur de transcription a été récemment identifié au niveau de l'épithélium séminifère dans des spermatogonies pré-pubères (Yoshida *et al.*, 2004).

Etant donné les caractéristiques temporelles et spatiales de l'expression de *Ngn3*, ainsi que ses fonctions dans la neurogenèse et le lignage endocrine pancréatique et intestinal, il est probable que les séquences régulatrices contrôlant son expression intègrent des motifs capables de répondre à des signaux spécifiques ayant pour conséquence une distribution tissulaire spécifique des ARNm *Ngn3*. L'étude du promoteur du gène *Ngn3* est une approche intéressante pour la compréhension des mécanismes contrôlant la régulation de l'expression tissulaire restreinte de ce facteur au cours du développement dans les différents territoires épithéliaux cités ci-dessus. Ce type de problématique peut être abordé par l'utilisation d'outils

de transgénèse. De tels outils se sont avérés fructueux pour analyser les séquences promotrices de nombreux facteurs bHLH neuronaux [*Mash1* ; *Math1* ; *Ngn1* et 2] (Verma-Kurvari *et al.*, 1996; Helms et Johnson, 1998; Verma-Kurvari *et al.*, 1998; Helms *et al.*, 2000; Simmons *et al.*, 2001; Ebert *et al.*, 2003; Nakada *et al.*, 2004) ou d'autres facteurs de transcription tissus-dépendants tels que *Pax4* ou *Pdx1* dans le pancréas et le tractus gastro-intestinal (Brinkmann *et al.*, 1995; Stoffers *et al.*, 1999; Brink *et al.*, 2001; Gannon *et al.*, 2001).

Afin d'identifier les séquences responsables de l'expression tissulaire restreinte de *Ngn3* au cours du développement, nous avons généré des animaux transgéniques exprimant le gène rapporteur *LacZ* sous contrôle de différentes régions du promoteur distal de *Ngn3*. L'objectif est de définir les séquences minimales requises permettant de récapituler les caractéristiques temporelles et spatiales du patron d'expression du gène *Ngn3* au cours de l'embryogenèse.

MATERIEL ET METHODES

1 Régions génomiques et étude *in silico*

Deux fragments génomiques de 8,3kb et 3,85kb, désignés 3E12 et 9F6, contenant des régions régulatrices du gène *Ngn3* ont été isolés à partir d'une banque génomique de souris mâles, âgées de 8 semaines, de la lignée 129/SvJ (voir INTRODUCTION §3.1.2). La localisation et la cartographie de ces fragments ont été réalisées expérimentalement par profil de restriction (Florence Marsais - communication personnelle). Ces deux fragments ont été sous-clonés dans le plasmide pBluescriptSK. Leur séquence complète a été déterminée et analysée à l'aide des outils bioinformatiques à partir des logiciels et serveurs listés dans le **Tableau 10**.

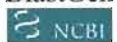
	Site Web	Liens internet	Références
Général	Infobiogen Genomatix   	http://www.infobiogen.fr/ http://www.genomatix.de/ http://www.ensembl.org http://www.ebi.ac.uk/services/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed	(Werner, 2003) (Scherf <i>et al.</i> , 2000) (Hubbard <i>et al.</i> , 2002) (Birney <i>et al.</i> , 2006)
Alignements de séquences (globaux & locaux)	Clustal Blastn/blast2 lalign/plalign	http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=lalign	(Lopez <i>et al.</i> , 2003) (Zhang <i>et al.</i> , 2000)
Homologies inter-espèces	BlastGen  UCSC Genome Bioinfo	Alignement clones génomiques contre génomes murins ou humain: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=10090 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=10116 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=9606 http://genome.ucsc.edu/	(Benson <i>et al.</i> , 2006) (Wheeler <i>et al.</i> , 2006) (Karolchik <i>et al.</i> , 2003)
Séquences répétées Ex: (GT) _n ; sine/line, alu...	RepeatMasker	http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker	A.F.A. Smit, R. Hubley & P. Green RepeatMasker http://repeatmasker.org
Motifs ou modules conservés	TFsearch, Jaspar TRANSFAC 4.0, 	http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/cl/cl.html http://www.genomatix.de/products/MatBase/MatBase3.html	(Cartharius <i>et al.</i> , 2005); (Sandelin <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 10 Références et sites bioinformatiques utilisés pour les analyses de séquences *in silico*

Les adresses référencées ici nous ont permis d'extraire les informations obtenues "*in silico*"; et de créer certaines des iconographies de ce manuscrit.

Le serveur Infobiogen, qui avait l'avantage de référencer tous les utilitaires permettant d'analyser *in silico* des séquences nucléotidiques et protéiques, nous a permis d'obtenir facilement une grande partie des résultats et iconographie de ce chapitre. Sa fermeture depuis l'été dernier est un frein regrettable à l'utilisation d'outils bioinformatiques.

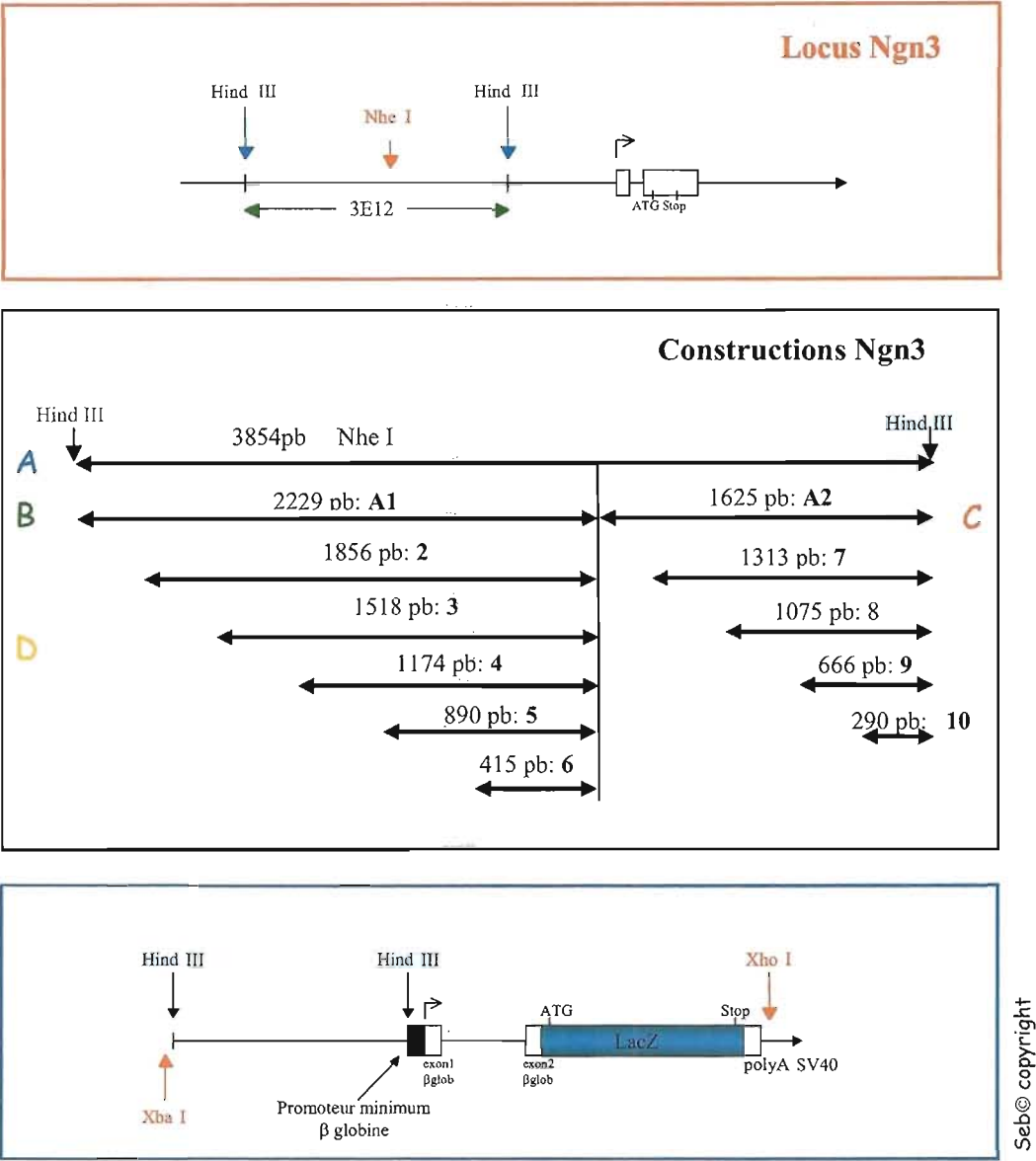


Figure 15 Synopsis des fragments génomiques obtenus par PCR & présentation de la cassette de transgénèse

Encadré en rouge est schématisé le locus de *ngn3* (murin). Le fragment utilisé en transgénèse 3E12 (représenté en vert) appartient à la région distale du promoteur de *ngn3*.

Encadré en noir se trouvent les différents fragments obtenus par PCR. Les lettres capitales insérées dans l'encadré noir correspondent aux constructions utilisées dans cette étude.

Encadré en bleu est représenté le fragment du vecteur de transgénèse BGZ40 qui sera injecté dans les œufs fécondés (XbaI/XhoI).

2 Cassettes de transgénèse

2.1 Délétions du fragment de 3,85kb

Tous les fragments générés à partir du fragment 3E12 ont été obtenus par polymérisation en chaîne (PCR -Polymerase Chain Reaction) en utilisant le système Roche "expand" (Roche Diagnostics S.A.). De plus, ils possèdent "des extrémités HindIII" ajoutées au cours de la réaction de PCR grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques de 20-25mers flanquées à leur extrémité 5' de la séquence palindromique spécifique de l'endonuclease HindIII. Cet artifice résumé dans la **Figure 15** a permis la préparation simultanée de 12 fragments.

Les différents fragments amplifiés ont été successivement purifiés sur une membrane de silice (PCR extract kit - Qiagen), sous clonés en "TA cloning" (PGEMTeasy - Promega Corporation) et séquencés afin de s'assurer de leur intégrité (PerkinElmer).

2.2 Clonage des fragments génomiques dans le vecteur de Transgénèse BGZ40

Le vecteur BGZ40 (Choi *et al.*, 1991; Yee et Rigby, 1993) utilisé dans cette étude nous a été donné par Jeannette Nardelli. Il possède une cassette de transgénèse, composée du promoteur minimal de la β globine suivi de la séquence codant le gène rapporteur *LacZ*. Ce gène d'origine bactérienne (*E. coli*) code la protéine β -galactosidase (β -GAL) dont l'activité enzymatique est d'hydrolyser les β -galactosides. En amont de cette cassette est positionné un site multiple de clonage permettant d'insérer les séquences régulatrices d'intérêt. Après migration sur gel d'agarose et élution sur membrane de silice (QIAquick Gel Extract - Qiagen), les 12 fragments génomiques de *Ngn3* ont été purifiés et sous-clonés dans le vecteur de transgénèse BGZ40-1230, en amont du promoteur minimal de la β globine (site HindIII). L'orientation et l'intégrité des clones obtenus ont été vérifiées par séquençage. Les quantités de chaque plasmide nécessaire à la micro-injection ont été produites par le système "Endo Free Plasmid Maxi" (Qiagen).

3 Transgénèse

Toutes les techniques mises en œuvre pour créer au laboratoire un service commun de transgénèse sont conformes aux recommandations des manuels "manipulating of the mouse embryos" (Hogan *et al.*, 1994; Behringer *et al.*, 2003) et sont très précisément décrites dans le manuel de transgénèse de la plateforme (Dussaud, 2003). Dans cette partie, nous

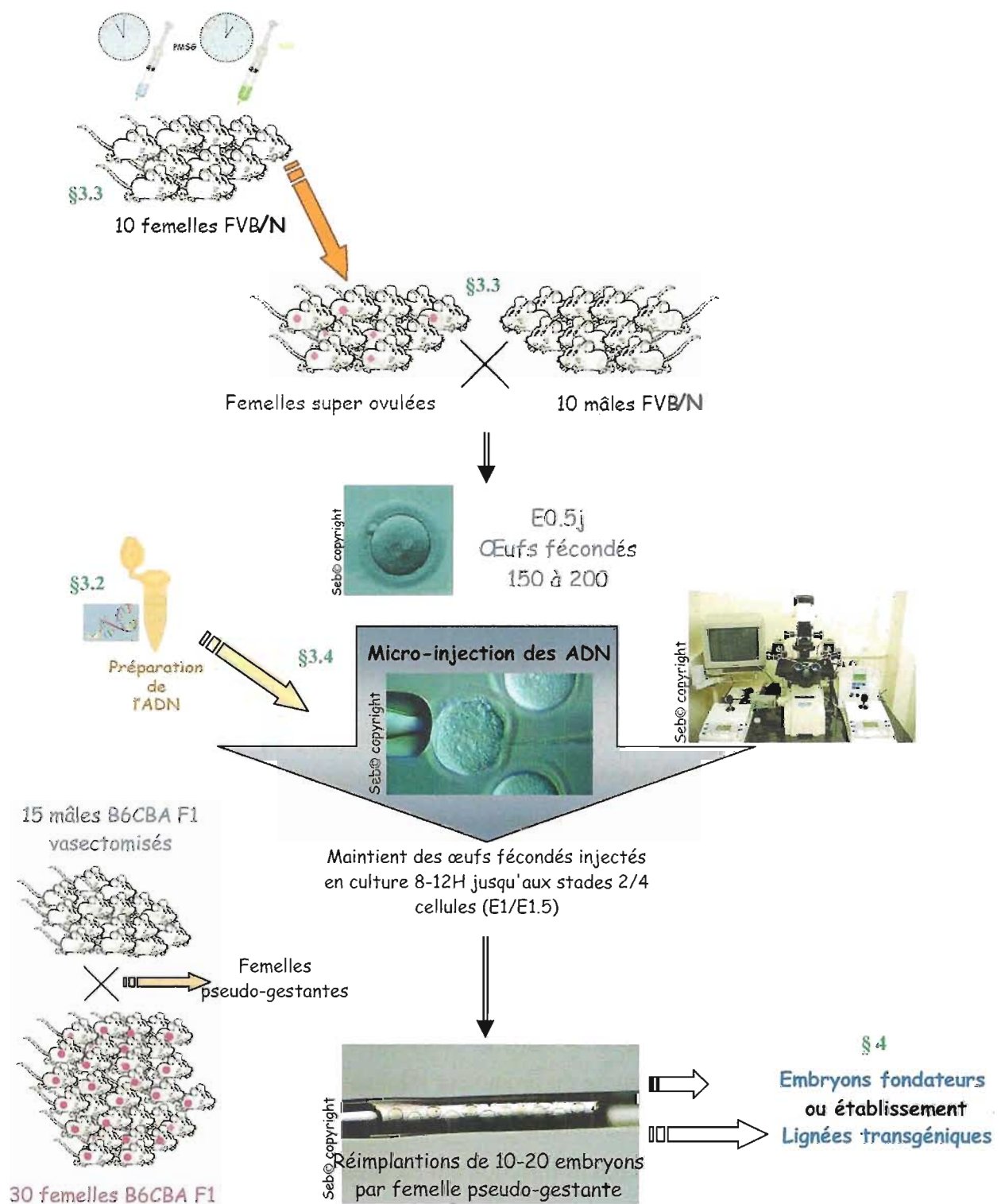


Figure 16 Synopsis d'une expérience de transgénèse classique

Les chapitres de référence à chacune de ces étapes sont indiqués **en vert**. Les photos ont été prises lors d'expériences effectuées au laboratoire et sont extraites de (Dussaud, 2003).

développerons brièvement les étapes clés qu'il a fallu optimiser pour faire fonctionner la plateforme de transgenèse. Les efforts se sont concentrés sur : **(i)** la qualité de préparation des ADN injectés ; **(ii)** l'amélioration du rendement d'obtention des œufs fécondés ; **(iii)** le taux de survie des œufs injectés.

Sur la **Figure 16** se trouvent résumées toutes les étapes permettant de générer les embryons fondateurs ou des lignées transgéniques.

3.1 Quelques définitions

Une nomenclature particulière est utilisée en transgenèse additive:

- ❖ Sont déclarés **transgéniques** les embryons (ou animaux) ayant intégré dans leur génome la cassette de transgenèse. La vérification s'effectue par le génotypage de l'ADN génomique (ADNg) extrait de biopsies de queues ou d'annexes embryonnaires. Dans cette étude, le génotypage a été effectué par PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques de *LacZ* (voir § matériel et méthodes).
- ❖ Sont déclarés **fondateurs** les embryons (ou animaux) transgéniques dans lesquels le transgène rapporteur est exprimé. La détection de l'expression du gène rapporteur *LacZ* peut être réalisée soit par coloration X-gal *in toto*, soit par marquage immuno-histologique à l'aide d'un anticorps anti- β galactosidase. Par cette approche, il est important de savoir qu'une fois les embryons prélevés, la lignée est définitivement perdue.

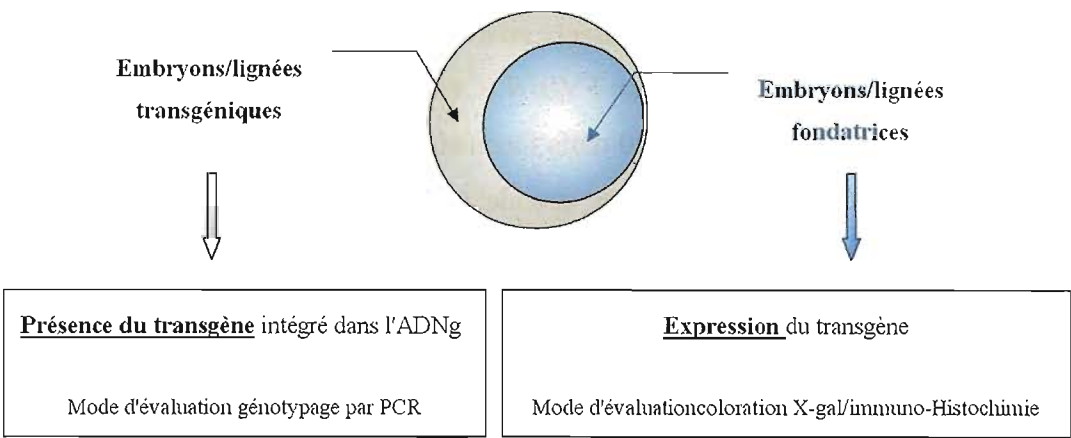


Figure 17 Différence entre embryons transgéniques et fondateurs : une question d'expression du transgène

- ❖ La **pénétrance du transgène** pour chacun des territoires étudiés est souvent représentée par le rapport entre le nombre d'embryons transgéniques exprimant le transgène dans le tissu concerné et le nombre total d'embryons transgéniques. En d'autre terme il s'agit de la proportion de fondateurs parmi les animaux transgéniques, et cela pour un tissu donné. Elle permet d'apprécier la qualité d'expression des différentes cassettes.

3.2 Purification des cassettes transgéniques

La purification de la cassette de transgénèse est une étape déterminante. Le soin apporté à toutes les étapes de préparation de l'ADN à micro-injecter facilite l'étape délicate de l'injection et conditionne la survie des œufs injectés.

Les cassettes de transgénèse sont linéarisées de façon identique par digestion par les enzymes de restriction XbaI et XhoI afin d'éliminer au maximum les séquences plasmidiques. Les fragments ainsi obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). Les ADN sont élués et purifiés soit par électro-élution et micro-dialyse, soit en utilisant le même kit d'élution Qiagen précédemment décrit (QIAquick Gel Extract - Qiagen) (§2.2). Les ADN linéaires correspondant aux cassettes de transgénèse sont dissous dans une solution de Tris-HCl (10 mM), EDTA (0,1 mM) pH 7,4, qui est aussi utilisée comme tampon pour la micro-injection. Les différentes constructions sont alors prêtes pour être micro-injectées.

3.3 Obtention des œufs fécondés

Quatre lignées de souris sont nécessaires pour générer des souris transgéniques. Un espace de notre animalerie est donc uniquement consacré au maintien de chacune de ces lignées.

Nous avons utilisé la lignée consanguine FVB/N (Centre Elevage Janvier, Le Genest St Isle) qui permet d'obtenir une moyenne de 20 œufs fécondés par femelle. Les pro-noyaux des œufs produits à partir de cette lignée sont de grande taille (pronucléi et nucléoles clairement visibles au microscope en contraste interférentiel Hoffman). Ils sont plus résistants à la lyse lors de l'injection d'ADN par rapport aux œufs issus d'autres lignées utilisées en transgénèse (Taketo et al 1991).

Le rendement maximum d'obtention d'œufs fécondés chez une souris mature est de 6 à 10 œufs en moyenne. La production d'œufs fécondés peut être multipliée par 3 en induisant une « super-ovulation » chez des femelles sexuellement immatures. Cette induction se fait par

injection d'hormones placentaires: 1) une injection de PMSG (pregnant mare's serum gonadotrophin) qui mime la FSH (follicle stimulating hormone) en stimulant la maturation ovarienne et folliculaire ; 2) une injection, 22 heures plus tard, de HCG (Human chorionic gonadotrophin), qui se substitue à l'hormone lutéinique (LH pour luteinizing hormone) nécessaire à la maturation du follicule. Les doses injectées sont de 5U par souris. Immédiatement après la seconde injection d'hormone, la femelle FVB/N est directement mise en accouplement avec un mâle pendant toute la nuit.

Pour que la fécondation soit efficace, les mâles fertiles, âgés de 8 semaines au minimum et de 8-10 mois au maximum, doivent être toujours isolés (repos hormonal).

3.4 Taux de survie des œufs injectés

La technique la plus utilisée en transgénèse additive chez les mammifères est la micro-injection (Gordon et Ruddle, 1981). Cette technique consiste à injecter plusieurs centaines de copies du fragment d'ADN dans des embryons au stade pronuclei (stade une cellule), afin de favoriser leur intégration dans le génome hôte. Cette injection s'effectue directement dans l'un des pro-noyaux (mâle le plus souvent car plus gros, plus périphérique et donc plus accessible) à l'aide d'une micropipette. Cette technique, invasive et agressive, aboutit à la mort d'un grand nombre d'embryons. Seuls 25% des embryons réimplantés dans les mères porteuses donneront naissance à des petits, et seulement 15 à 25% de ces animaux seront transgéniques. Au laboratoire, Sébastien Dussaud a montré pendant son stage de spécialisation en Génomique Fonctionnelle (Dussaud, 2003) que la survie des œufs est dépendante de la concentration de l'ADN injecté. En effet, une concentration de 1ng/μl permet un taux de survie de l'ordre de 70%, qui est réduit à 30% pour une quantité injectée de 5ng/μl. La mesure précise de la concentration en ADN est donc extrêmement importante. Elle est déterminée, après migration des fragments d'ADN sur gel d'agarose, par comparaison avec une gamme de marqueur de poids moléculaire. La solution d'ADN à injecter est ajustée avant la manipulation à la concentration finale souhaitée.

La micro-injection des différentes cassettes de transgénèse est effectuée dans des œufs fécondés (stade E0.5) immergés dans une goutte de milieu M2(Sigma-Aldrich) sous huile minérale (Sigma-Aldrich). Les œufs sont ensuite maintenus en culture dans un milieu de survie (M2) avant d'être triés en fonction de leur passage aux stades 2 à 4 cellules (correspondant à un stade E1 ou E1.5) puis réimplantés dans l'*infundibulum* d'une femelle pseudo-gestante B6CBAF1.

4 Etudes des embryons transgéniques

4.1 Collecte des embryons transgéniques

Au terme des stades embryonnaires d'intérêt (neural/E10.5-E11.5 et endocrine/E14.5-15.5), les femelles B6CBA F1 réimplantées et gestantes sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les embryons sont prélevés des cornes utérines dans une solution de PBS. Selon l'étude réalisée, les embryons seront fixés *in toto* : (i) 30 min dans une solution de paraformaldéhyde [PFA] à 1% dissoute dans le tampon β -Gal (pour 10mL : 2 mL NaH₂PO₄ 1M ; 3 mL Na₂HPO₄ 1M ; 250 μ L KCl 2M ; 50 μ L MgCl₂ 1M pH 7.4) pour l'analyse par coloration *in toto* sur tissus disséqués ou sur sections au vibratome (coupes épaisses) ; (ii) 1 heure ou 24 heures dans une solution PFA 4% préparée extemporanément en PBS pour l'analyse par immuno-histochimie et hybridation *in situ*, respectivement sur coupes épaisses (300 μ m) ou cryo-sections (14 μ m).

4.2 Vérification de l'intégration des transgènes par PCR

Le génotypage des embryons est réalisé à partir des annexes embryonnaires ou, dans le cas des lignées établies, à partir de biopsies des queues de souris prélevée 10 à 20 jours après la naissance des animaux. Une réaction de PCR sur l'ADNg de ces embryons permet de confirmer ou d'infirmer la présence de *LacZ*.

L'ADNg est obtenu après une hydrolyse à 55°C des annexes ou des prélèvements de queues par la Protéinase K (0,8 mg/mL) dans 500 μ L de tampon de génotypage [Tris-HCl (50mM) pH8, d NaCl (100mM), Tween20 (0,5%)]. Après une nuit d'incubation, la protéinase K est dénaturée thermiquement (15min à 95°C). L'intégrité de l'ADNg est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Ensuite un microlitre du produit de digestion est utilisé comme matrice d'ADNg pour la réaction de génotypage.

Le génotypage de l'ensemble des animaux et des embryons a été effectué par PCR sur les ADNg en utilisant un couple d'amorces spécifiques du gène *LacZ* (*LacZ3* = 5'-GAGTGTGATCATCTGGTCGCT₃' et *LacZ4* = 5'-GCGTACTGTGAGCCAGAGTT₃') générant un amplicon de 744 nucléotides spécifique de la cassette de transgenèse. La présence ou l'absence de cet amplicon, analysée par électrophorèse sur gel d'agarose, détermine le génotype des embryons. La spécificité des bandes visualisées est systématiquement vérifiée par séquençage. Un ADNg qui contient une copie par équivalent génome du gène *LacZ* est utilisé comme contrôle positif dans chaque série de PCR. Un témoin négatif ne contenant pas d'ADN génomique permet de

vérifier l'absence de toute contamination. Seuls les embryons validés comme transgéniques, préalablement génotypés, ont été analysés par coloration X-gal, par hybridation *in situ* et/ou par immunohistochimie.

4.3 Détection de l'expression du transgène rapporteur par coloration X-gal *in toto*

Le patron d'expression de la β -gal est évalué sur des coupes fines par immunohistochimie (Kiefer et al. 2005) précédée ou non d'une hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde spécifique de *Ngn3* (Ravassard *et al.*, 1997a).

L'enzyme β -GAL hydrolyse l'analogue du galactose X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) et forme un précipité bleu colorant, de façon stable les cellules dans lesquelles le gène *LacZ* est exprimé. La réaction enzymatique est effectuée à température ambiante pendant une nuit à l'abri de la lumière dans le tampon β -gal supplémenté par 0,15% de X-gal, 5mM de solutions de potassium ferricyanide/ferrocyanide $K_3Fe(CN)_6$ et $K_4Fe(CN)_6$.

Dans cette étude, le transgène n'étant pas pourvu d'une séquence d'adressage dans un compartiment subcellulaire particulier, la détection du produit coloré sera visible dans le cytoplasme des cellules exprimant le transgène. Cette coloration est facilement identifiable sous microscope à contraste de phase. Afin d'étudier les profils de coloration X-gal notamment dans le SNC, les embryons au préalable colorés sont inclus dans la gélatine/BSA et coupés au vibratome en immersion dans une solution de PBS en coupes épaisses de 100 μ m. Afin de confirmer la spécificité des marquages obtenus *in toto*, un marquage immunohistochimique sur coupes fines a été réalisé avec un anticorps anti- β GAL (Trocmé *et al.*, 2001), afin de confirmer la spécificité des marquages obtenus *in toto*.

4.4 Hybridation *in situ* et immuno-histochimie

Au LGN, nous avons une grande expertise des différentes techniques d'hybridation *in situ*. Ce savoir-faire m'a amenée à participer à de nombreuses rencontres scientifiques et collaborations mentionnées dans la seconde et troisième partie des résultats (Emi0363/R. Scharfmann-U513/S. El Mestikawy). Les travaux d'hybridation *in situ* présentés ici ont été réalisés de la manière décrite dans les publications du laboratoire et associés (Ravassard *et al.*, 1997b; Herzog *et al.*, 2001; Sagne *et al.*, 2001; Gras *et al.*, 2002; Côté *et al.*, 2003; Herzog *et al.*, 2004; Landry *et al.*, 2004; Castaing *et al.*, 2005b; Gras *et al.*, 2005; Kiefer *et al.*, 2005; Lecomte *et al.*, 2005; Nickerson Poulin *et al.*, 2006).

Les ribosondes "froides" sont produites à partir de plasmides contenant des matrices d'ADN et préalablement linéarisés. Pour la sonde *LacZ*, un fragment de 2044pb du gène *LacZ* a été amplifié par PCR avec les oligonucléotides suivants (LacZ1 : 5'ACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCG3' et LacZ4 : 5'GCGTACTGTGAGCCAGAGTT3') a été a été sous-cloné dans le vecteur PGEMT-easy (Cote *et al.*, 2003). La sonde insuline de rat nous a été fournie par Annie Basmaciogullari et Sophie Mahé (U457/E0363) (Duvillie *et al.*, 2006). La sonde *Relax/Ngn3* a été décrite précédemment (Ravassard *et al.*, 1997b; Castaing *et al.*, 2005a; Duvillie *et al.*, 2006).

Le marquage des sondes est obtenu par transcription *in vitro* (RNA polymérase T7 et Sp6-Promega Corporation) en présence de dNTP a été modifié et porte l'épitope qui sera reconnu par le fragment F(ab')₂. Ce dernier est couplé à la phosphatase alcaline qui permettra la réaction d'oxydoréduction colorimétrique *in situ* des substrats NBT/BCIP (NitroBlue Tetrazolium chloride / 5-Bromo-4- Chloro-3-Indolyl-Phosphate) en bleu et INT/BCIP (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-phenyl-Tetrazolium chloride / BCIP) en rouge. Afin d'obtenir un marquage spécifique de la sonde synthétisé *in vitro*, la proportion d'UTP non marquée et de 2/3 versus 1/3 d'UTP marqué par la digoxygénine-11-UTP [DIG-UTP] (Roche Diagnostics S.A.), la fluorescéine-12-UTP [Fluo-UTP] (Roche Diagnostics S.A.) ou par la dinitrophenyl - 11 - dUTP [DNP] (PerkinElmer).

Le patron d'expression de la β GAL, évalué sur coupes fines par immunohistochimie précédée ou non d'une hybridation *in situ* *Ngn3*, est réalisé selon les protocoles décrits dans les publications du laboratoire (Ravassard *et al.*, 1997b; Kiefer *et al.*, 2005).

ANALYSE DE LA CAPACITE D'EXPRESSION TISSU-SPECIFIQUE APPORTEE PAR LES FRAGMENTS GENOMIQUES NGN3

1 Analyse *in silico* des régions promotrices du gène *Ngn3*

Nous disposons au laboratoire de plusieurs clones génomiques contenant le gène *Ngn3*. Ils ont été obtenus par le criblage d'une banque génomique murine commerciale à l'aide d'une sonde contenant un fragment d'ADNc de la région 5' non codante de *Relax* (voir introduction, §2.2.2). A l'issue de ce criblage, deux clones, nommés 9F6 (8,3 kb) et 3E12 (3,8 kb), nous ont paru intéressants pour l'étude des éléments régulateurs contrôlant l'expression tissulaire restreinte du gène *Ngn3* (communication personnelle F. Marsais et P. Ravassard). Avec l'avancement du séquençage des génomes, l'alignement *in silico* des fragments génomiques de *Ngn3* a permis de générer une cartographie de ces régions, d'évaluer leurs positions au sein du locus du gène *Ngn3* et de les comparer avec les séquences des homologues ou des autres membres de la famille des neurogénines.

1.1 Particularités des clones 9F6 et 3E12: séquences promotrices strictes ou non?

La **Figure 18** permet de positionner les deux clones 3E12 et 9F6 dans la région génomique de *Ngn3*.

1.1.1 Le clone 9F6

Ce clone contient : i) la totalité de la séquence codante (645pb). Il possède donc la séquence nécessaire et suffisante à l'initiation de la transcription par l'ARN Pol II (promoteur minimal capable de fixer les facteurs généraux de transcription). La position de la première base du site de démarrage de la transcription a été déterminée (voir introduction ; §3.1.3); ii) une région promotrice de 6,7 kb située en amont du site de démarrage de la transcription ; iii) une région de 1 kb située en aval de la région codante.

1.1.2 Le clone 3E12

Le second clone génomique est un fragment plus court (3862pb) qui est inclus dans le fragment 9F6, comme le révèle l'alignement de sa séquence avec celle de la région génomique de *Ngn3* et du clone 9F6.

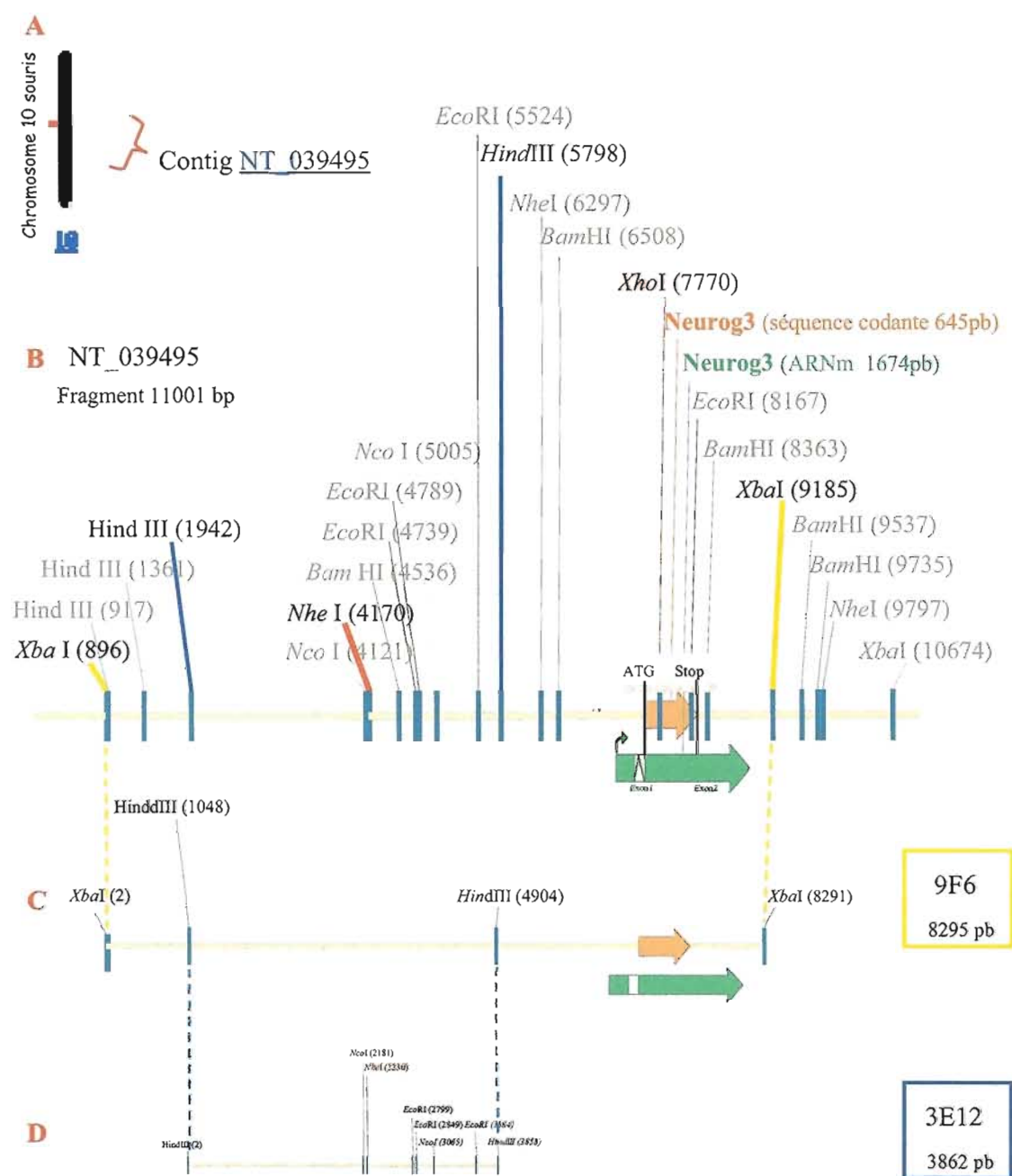


Figure 18 Cartographie des fragments génomiques de *ngn3*

Le locus de *ngn3* se trouve chez la souris sur le chromosome 10 (contig NT_039495) [A]. La figure [B] représente un zoom des 11kb entourant la région codante de *ngn3* (en orange). Les deux clones 9F6 & #3E12 obtenus par criblage d'un banque génomique ont été alignés par rapport au locus et sont représentés avec leur sites de restriction d'intérêt, respectivement en [C] & [D].

Il est localisé à environ 1,7kb en amont du codon d'initiation de la traduction. Ce fragment contient une partie du promoteur distal. En revanche, il ne contient ni la séquence codante de *Ngn3*, ni *à priori* le promoteur proximal sur lequel vient se fixer la machinerie basale de transcription (TSS). Il s'agit donc d'une séquence exclusivement régulatrice ou "enhancer". Nous avons vérifié dans les banques d'EST et par recherche des motifs qu'aucun transcrit n'a pu être identifié dans cette région.

1.1.3 Synténie et conservation inter-espèces

Nous avons vu dans l'introduction que la séquence du gène de *Ngn3* était contenue dans des régions chromosomiques synténiques entre l'homme, la souris et le rat (chromosomes 10, 10 et 20 respectivement- **Figure 6** §introduction2). Cette observation suggère qu'il doit exister au sein des séquences de régulation de *Ngn3*, des domaines conservés qui contrôlent l'expression du gène. Ces domaines ont été recherchés par empreinte phylogénétique, à l'aide de programmes informatiques spécialisés (banques de données ensembl, GenBank, Genomatix). Cette approche permet la comparaison de régions régulatrices orthologues d'un même gène présent (ou conservé) dans plusieurs organismes.

Nous avons donc recherché les séquences génomiques homologues au clone 3E12 afin de déterminer les régions de similitudes inter-espèces.

Nous avons obtenu les résultats suivant:

- ❖ Il existe une forte similitude (E-value=0) chez les mammifères entre les séquences murines (rat/souris) et humaines, plus particulièrement dans la région du clone 3E12.
- ❖ Il n'existe pas de similitude significative chez les taxons plus éloignés. En effet, l'alignement avec les séquences disponibles du génome du poulet indique une "homologie" avec un contig du chromosome 6, mais le score indiqué est faible (E-value=4e-43). Aucune similitude n'est obtenue avec le génome du poisson zèbre.
- ❖ L'absence de similitude entre les séquences promotrices de mammifères et la séquence de mTAP (homologue drosophilien de *Ngn3*) confirme que les contraintes de sélection responsables de la conservation des éléments régulateurs de *Ngn3* sont communes au taxon mammifère.

Grâce à cette analyse informatique, nous avons pu identifier des séquences similaires chez les mammifères. L'utilisation de l'algorithme d'alignement local a permis de comparer ces séquences entre elles. Les différents graphiques et scores du **Tableau 11** résument les homologies observées à partir des alignements réalisés sur blast, dialign, genomatix et UCSC genome.

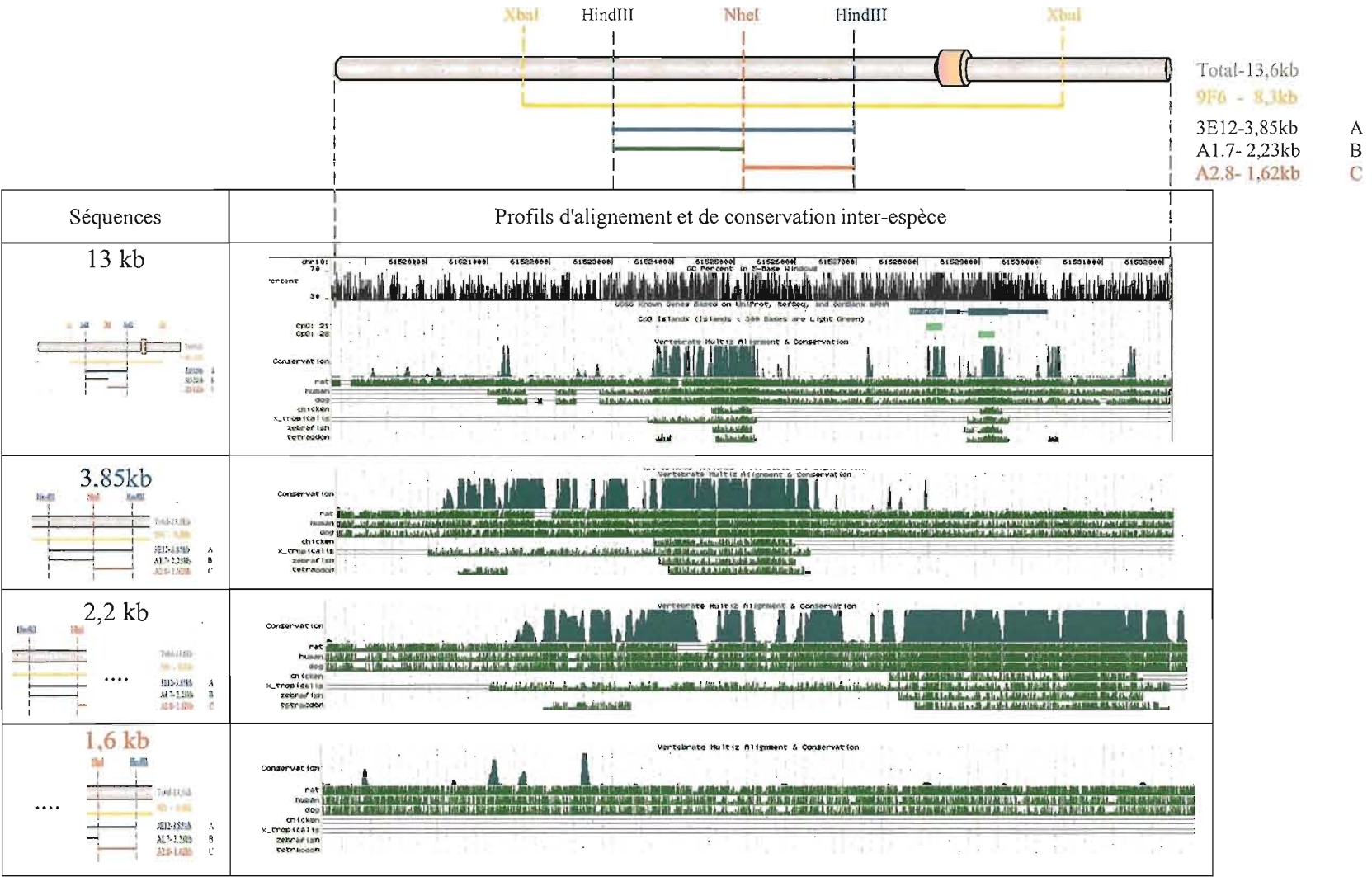


Tableau 11 Profils de conservation inter-espèces des fragments génomiques de *ngn3*
 Images des profils de conservation inter-espèces obtenus d'après les données du serveur UCSC genome Browser.
 Cette interface graphique visuelle fait ressortir une forte conservation de séquence au niveau de la région (clone **3E12**) utilisée en transgénèse et notamment dans sa **partie 5'** ce qui a orienté la stratégie d'obtention des fragments délétés par dichotomie et l'ordre d'injection des différentes cassettes (construction **A>B>C...**).

Les résultats montrent que les séquences promotrices humaine et murine (souris) possèdent un faible degré d'homologie globale (seulement 28%). En revanche, les séquences promotrices de la région 3E12 présentent une forte homologie globale (66%). A l'intérieur de cette région, la séquence positionnée en 5' du site de restriction NheI (notre point de référence), se trouve encore plus fortement conservée. Le fragment génomique 3E12 contient donc des séquences très conservées au sein des mammifères. Ces séquences contiennent très probablement des éléments de régulation sur lesquels se lient des facteurs de transcription, qui participent à la régulation de l'expression génique de *Ngn3* au cours du développement.

2 Obtention des constructions pour la transgénèse

La transgénèse constitue la plus puissante approche *in vivo* lorsque l'on souhaite rechercher les éléments régulateurs responsables de l'expression restreinte et transitoire d'un gène au cours du développement. Nous avons donc choisi cette approche pour identifier les séquences régulatrices qui contrôlent l'expression tissulaire restreinte de *Ngn3*. Au vu des résultats de l'étude *in silico* du promoteur du gène *Ngn3*, nous avons analysé dans un premier temps le fragment génomique 3E12 par transgénèse. Dans un deuxième temps, ce fragment a été divisé en fragments de plus petite taille, afin d'analyser leur effet sur l'expression du gène rapporteur *LacZ*.

L'analyse de la carte de restriction de la séquence la région 3E12 révèle peu de sites de restrictions uniques. C'est pourquoi, tous les fragments générés à partir de cette région ont été obtenus par amplification par PCR. Afin de faciliter les clonages et de placer tous ces fragments dans le même environnement nucléique, nous avons ajouté à leurs extrémités les séquences palindromiques spécifiques de l'endonucléase HindIII. L'intégrité des fragments délétés a été vérifiée par séquençage systématique des deux brins d'ADN. Les différents fragments ont ensuite été clonés dans le vecteur de transgénèse BGZ40 (voir matériel et méthodes). La caractéristique de ce vecteur réside dans le promoteur minimal utilisé qui correspond à la région d'assemblage de la machinerie de base de la transcription du gène de la β -Globine (Fraser *et al.*, 1993; Foley *et al.*, 1994; Grosveld *et al.*, 1998). Cette région est nécessaire mais pas suffisante pour diriger l'expression d'un transgène *in vivo*. Ainsi, le clonage de régions potentiellement régulatrices en amont de ce promoteur minimal permet d'élucider *in vivo* leur caractère activateur (*enhancer*). De plus, l'utilisation du gène rapporteur *LacZ* permet : (i) de bénéficier de la haute stabilité du produit de ce gène ; (ii) de

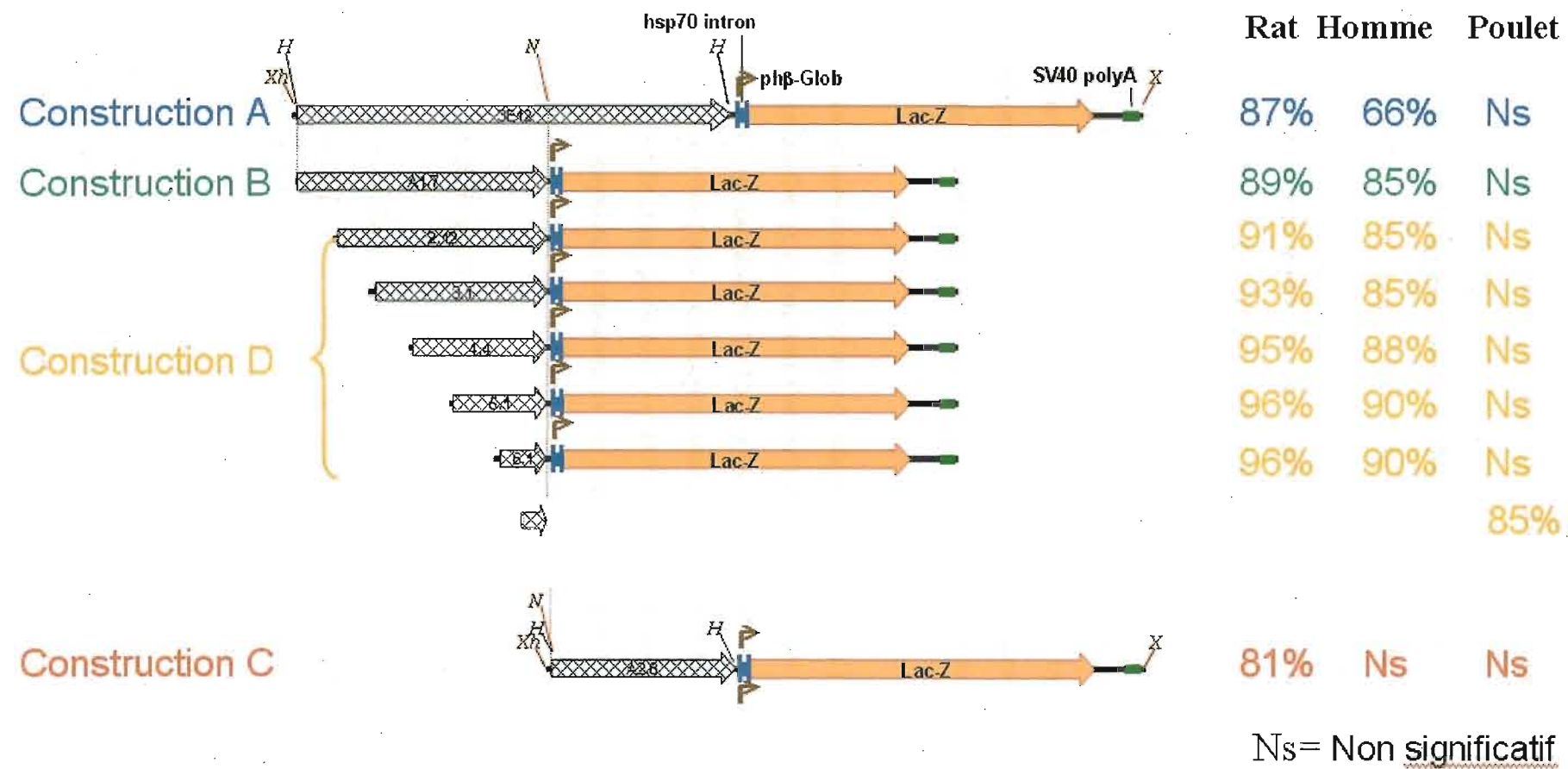


Figure 19 Constructions de transgénèse générées et homologues inter-espèces

Les niveaux de conservation souris/rat/homme/poulet sont indiqués pour chaque fragment.

comparer facilement le patron d'expression de *Ngn3* endogène et celui de chaque construction par hybridation *in situ* et immunohistochimie anti- β galactosidase.

Les constructions de transgenèse (nommées de A à D) contenant les fragments génomiques de différentes tailles sont représentées dans la **Figure 19**.

- (i) La construction **A** contient une région régulatrice de 3,85kb de *Ngn3*, flanquée à ces extrémités d'un site de restriction Hind III.
- (ii) Les constructions **B** (2,2kb) et **C** (1,6kb) ont été obtenues par dichotomie grâce à la présence d'un site unique de reconnaissance de l'enzyme de restriction Nhe I dans la séquence du fragment 3E12.
- (iii) Les constructions de la série **D** ont été générées en délétant les fragments **B** et **C** de proche en proche (tous les 400 pb).

3 Etude du fragment **A** par transgenèse : résume-t-il l'expression du transgène rapporteur dans les territoires endogènes de *Ngn3* ?

Une première série d'injections de la construction **A** [Pm *Ngn3* (3,85kb)- *LacZ*] au CDTA nous a permis de réimplanter des femelles pseudo-gestantes et d'obtenir trois fondateurs (F0) 1535, 1536 et 1540 sur un fond génétique FVB/N et la transmission du transgène (F1) a été dans un premier temps vérifiée. Les premières analyses ont été réalisées sur des embryons issus de croisements inter-hétérozygotes issus de la F1 afin de statuer sur les lignées transgéniques à établir.

3.1 Variabilité du niveau d'expression du gène rapporteur *LacZ*

Nous avons analysé le niveau d'expression de la β gal dans le système nerveux des embryons (stade E11,5) issus des différentes lignées hétérozygotes. Plus le niveau d'expression de la β gal est faible, et plus la coloration X-gal est difficile à détecter. Dans ce cas, il est possible de caractériser les cellules Xgal+ par détection immuno-histochimique. Les résultats sont les suivants :

- Dans la lignée 1535 : le niveau d'expression du transgène *LacZ* est faible, la coloration X-gal *in toto* est peu ou pas détectée. L'expression de la β gal est analysée par immunohistochimie dans la descendance de la première génération (F1).

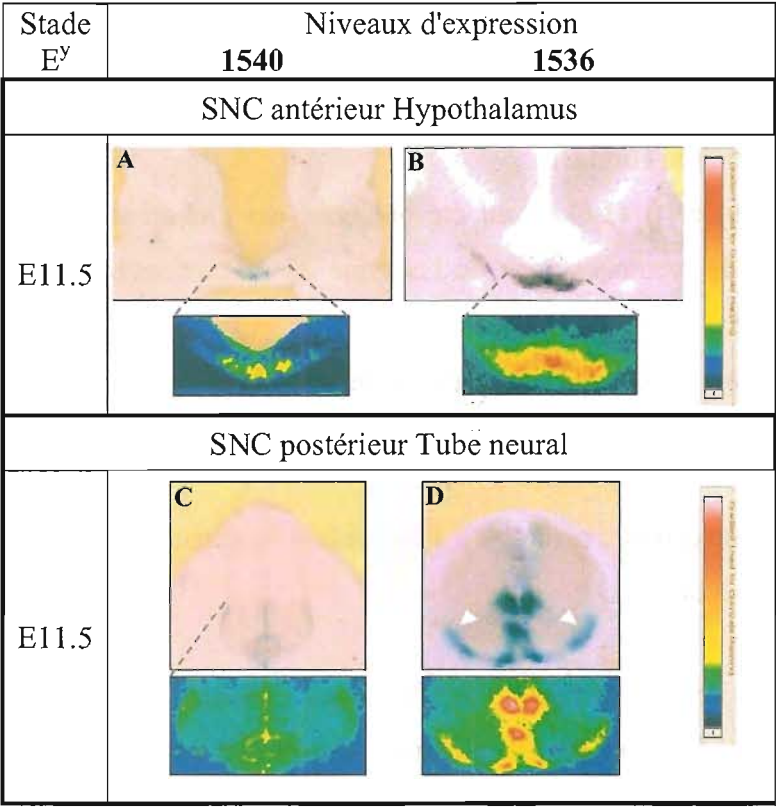
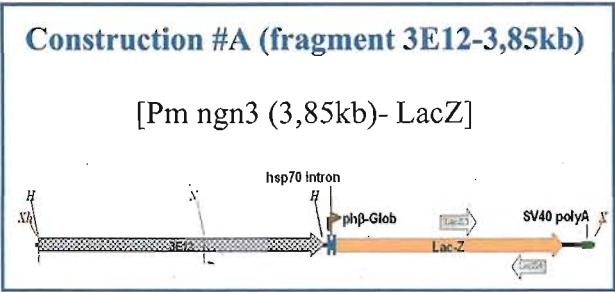


Figure 20 Comparaison de l'expression de la β -galactosidase dans le SNC des deux lignées établies

Cette figure est représentative de la variation du niveau d'expression systématiquement observé chez les embryons issus des lignées 1536 et 1540. L'expression de la β -galactosidase est visualisable par coloration *in toto* sur des embryons à E11.5. Afin de comparer le niveau d'expression, les colorations ont été effectuées en même temps.

Les photos présentées ici sont, pour la région hypothalamique, des coupes frontales (parallèles à l'axe céphalo-caudal) et transversales (perpendiculaires à l'axe céphalo-caudal) de 300 μ m d'épaisseur réalisées au vibratome. Les intensités de coloration sont représentées en "fausses couleurs" en dessous de chaque figure sur la région d'intérêt. L'index de fausse couleur indique une expression faible matérialisée par les teintes froides et élevée pour les teintes chaudes.

A-B: Plan de coupe au niveau de l'hypothalamus d'embryons #1540 et #1536.

Comme attendu, seule la région la plus ventrale de l'hypothalamus exprimant normalement *ngn3* est marquée par le X-gal. Dans ce territoire, le marquage X-gal des embryons 1536 apparaît plus fort que pour les embryons 1540.

C-D Plan de coupe au niveau du tube neural d'embryons #1540 et #1536.

On reconnaît le marquage ventral caractéristique de l'expression de *ngn3* sous forme de deux bandes deux bandes (ventrale et médiane). Le marquage X-Gal en position latérale correspond aux prolongements des cellules de la zone ventrale.

Au niveau du tube neural postérieur, l'adressage cytoplasmique de la protéine β -galactosidase permet de tracer les prolongements des cellules neuronales projetant à l'extérieur de la zone neuro-épithéliale (tête de flèche blanche).

- Dans la lignée 1540 : Le niveau d'expression du transgène est détectable par coloration X-gal *in toto* mais il reste toutefois de faible intensité.
- Dans la lignée 1536 : le niveau d'expression de la β galactosidase est élevé.

La **Figure 20** rend compte de la variation d'expression du transgène entre les lignées 1536 et 1540 au niveau des territoires nerveux.

Ces observations nous ont conduits à ne pas établir la lignée 1535 et à mener en parallèle l'analyse du patron d'expression du transgène dans les deux autres lignées.

Ces premières expériences ont permis de valider l'ensemble de la méthodologie de la transgénèse.

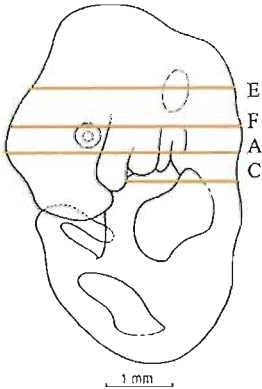
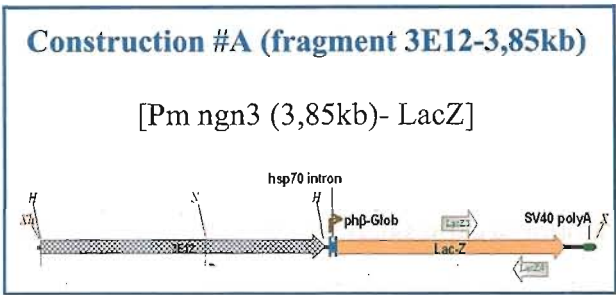
3.2 Analyse du patron d'expression de la cassette de transgénèse A

Les stades embryonnaires étudiés sont en accord avec les cinétiques d'expression transitoire de *Ngn3* décrites dans le chapitre §3.3. Nous avons donc choisi des stades de développement pertinents pour analyser l'expression du gène *Ngn3* dans le système nerveux central (E11.5-12,5 que nous appellerons aussi "stade neural") et pancréatique/intestinal (E14.5-15.5 ou "stade endocrine"). Grâce aux techniques d'hybridation *in situ* et d'immuno-histochimie, nous avons pu mettre en évidence la présence ou non des ARNm *LacZ* et/ou de la protéine β galactosidase (produit du transgène exprimé) dans des cellules qui expriment NGN3 endogène.

Les figures (Figure 20, Figure 21, Figure 23) de ce paragraphe résument les résultats obtenus pour la cassette #A et sont représentatives de 6 portées d'embryons (par stade étudié) pour chacune des deux lignées établies. Les patrons d'expression des deux lignées étant identiques, seule la distribution cellulaire de la lignée #1536 est illustrée. Toutefois, une différence d'intensité de la coloration β -gal est observée entre les deux lignées.

3.2.1 Dans le système nerveux central : mimétisme et ectopisme

Au stade embryonnaire E11.5, le patron d'expression de la cassette A dans le système nerveux des embryons des lignées 1536 et 1540 montre une corrélation avec le patron endogène de *Ngn3*. Le transgène est exprimé dans les territoires d'expression endogènes de *Ngn3* : le SNC antérieur (hypothalamus) et dans la moelle épinière.



	Distribution cellulaire β-galactosidase	Territoire endogène ngn3
SNC antérieur Hypothalamus		
SNC Postérieur Tube neural ventral		
Expression ectopique		

Figure 21 Patron d'expression du transgène A dans le SNC d'embryons E11.5

Ces images sont exclusivement obtenues sur la lignée 1536, cependant le patron LacZ⁺ est, certes plus faible mais strictement identique pour la seconde lignée établie 1540.

A-C, E-F: Coloration *in toto* sur Coupes épaisses (300µm) permettant de localiser les territoires en bleu, signalant *in situ*, l'activité de la β-galactosidase produit de l'expression de la cassette A; A savoir dans le territoire le plus ventral de l'hypothalamus et du tube neural; auxquels s'ajoute un territoire plus médian dans le tube neural.

B-D: Hybridation *in situ* sur coupes fines (14µm). Rappel du patron d'expression endogène de ngn3 à E11.5. Dans le tube neural, on reconnaît clairement les deux bandes ventrale (v) et médiane (m) d'expression de ngn3. Un marquage X-Gal est présent sur certaines sections en position latérale (voir figure 20/tête de flèche blanche). Ce marquage dépendu uniquement du plan de coupe et correspond aux prolongements des cellules de la zone ventrale.

E-F: Expression ectopique de la β-galactosidase au niveau du mesenchyme céphalique, la notocorde, du pédoncule optique.

Barres d'échelles : 200µm (A- B)- 500µm (E-F).

Le patron endogène *Ngn3* et la coloration X-gal concordent comme le montre les photos A et C de la **Figure 21**. Une forte pénétrance pour tous les territoires neuronaux est constatée à ce stade embryonnaire.

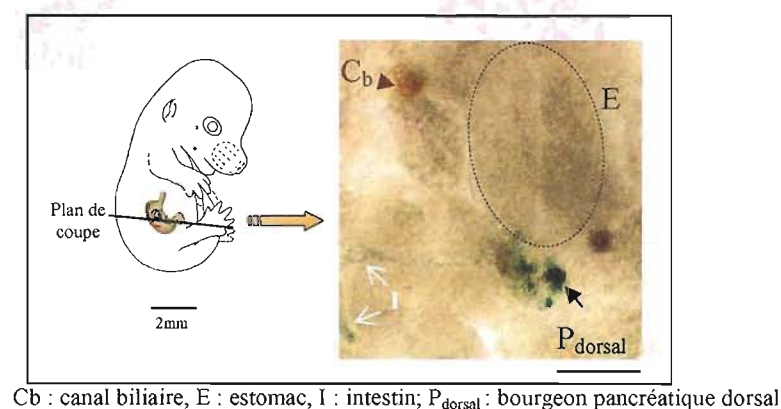
Au niveau de la moelle épinière l'adressage cytoplasmique de la protéine β -gal permet de tracer les prolongements des cellules neuronales projetant à l'extérieur de la zone neuro-épithéliale (tête de flèche blanche-**Figure 20**).

Toutefois, une expression ectopique est observée dans la région du pédoncule optique, la notochorde et le rhombencéphale, et ce chez les embryons des deux lignées (1536 et 1540). L'analyse du patron d'expression du transgène dans le SNC d'embryons à des stades plus tardifs est en cours.

3.2.2 Patrons endocrines : une forte pénétrance dans les territoires pancréatiques et intestinaux.

3.2.2.1 Au stade précoce du développement du pancréas

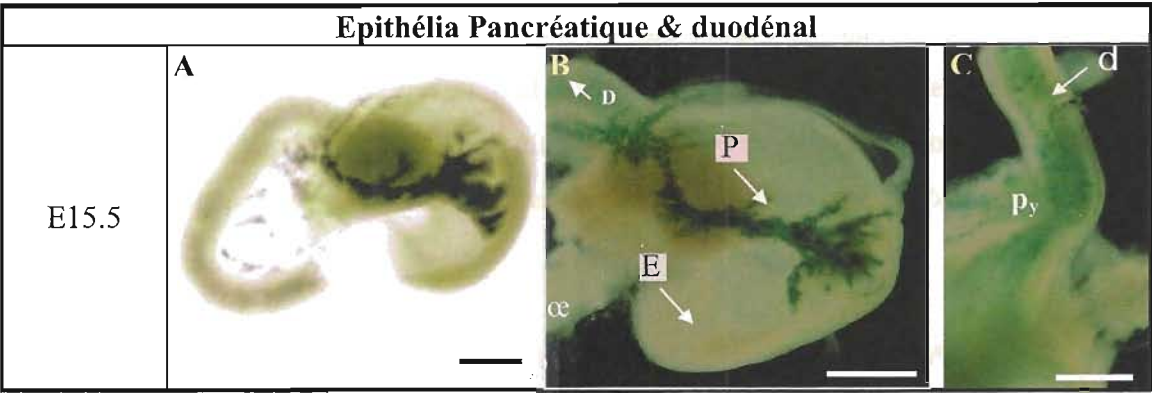
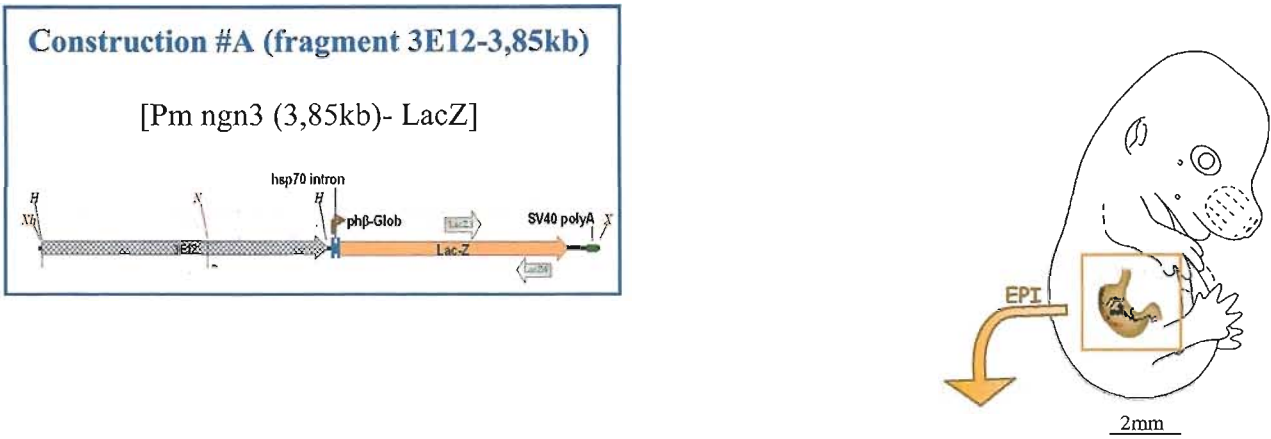
A un stade précoce du développement du pancréas (E11,5), nous avons observé un territoire discret exprimant *LacZ*, correspondant au *primordium* pancréatique dorsal comme indiqué sur **Figure 22** (ci-dessous). Ce marquage est détecté dans tous les embryons testés des lignées établies et ressemble à celui obtenu par hybridation *in situ* à l'aide d'une ribosonde *Ngn3*.



Cb : canal biliaire, E : estomac, I : intestin; P_{dorsal} : bourgeon pancréatique dorsal

Figure 22 Patron d'expression pancréatique précoce de la cassette de transgénèse A

Coloration Xgal sur sections transverses (coupes épaisses de 300µm) d'un embryon à E11.5. Ce plan de coupe passe par le bourgeon pancréatique dorsal qui exprime la β -gal (Xgal⁺). Un marquage est aussi obtenu au niveau intestinal. *Echelle : barre 50µm*



3.2.2.2 Expression de la cassette **A** dans le pancréas au stade embryonnaire E14.5

Plus tardivement (E14.5-E15.5) la coloration β -galactosidase *in toto* permet de mettre en évidence de nombreuses cellules Xgal⁺, comme attendu dans les territoires *ngn3* endogènes de l'épithélium pancréatique (**Figure 23**, panneau haut/A-B). Le marquage observé se restreint aux cellules contenues à l'intérieur de cet épithélium ramifié (marquage de cellules isolées). L'analyse sur coupes fines (**Figure 23**, panneau du bas/F-G) met en évidence un marquage des cellules exprimant le transgène localisées près des canaux majoritairement au centre de l'épithélium ce qui explique le marquage en pointillé observé sur les colorations *in toto*. La localisation par hybridation *in situ* des ARNm *LacZ* est exclusive des cellules exprimant l'insuline (figure G et H).

3.2.2.3 Patron d'expression endocrine intestinal au stade E14.5 (cassette **A**)

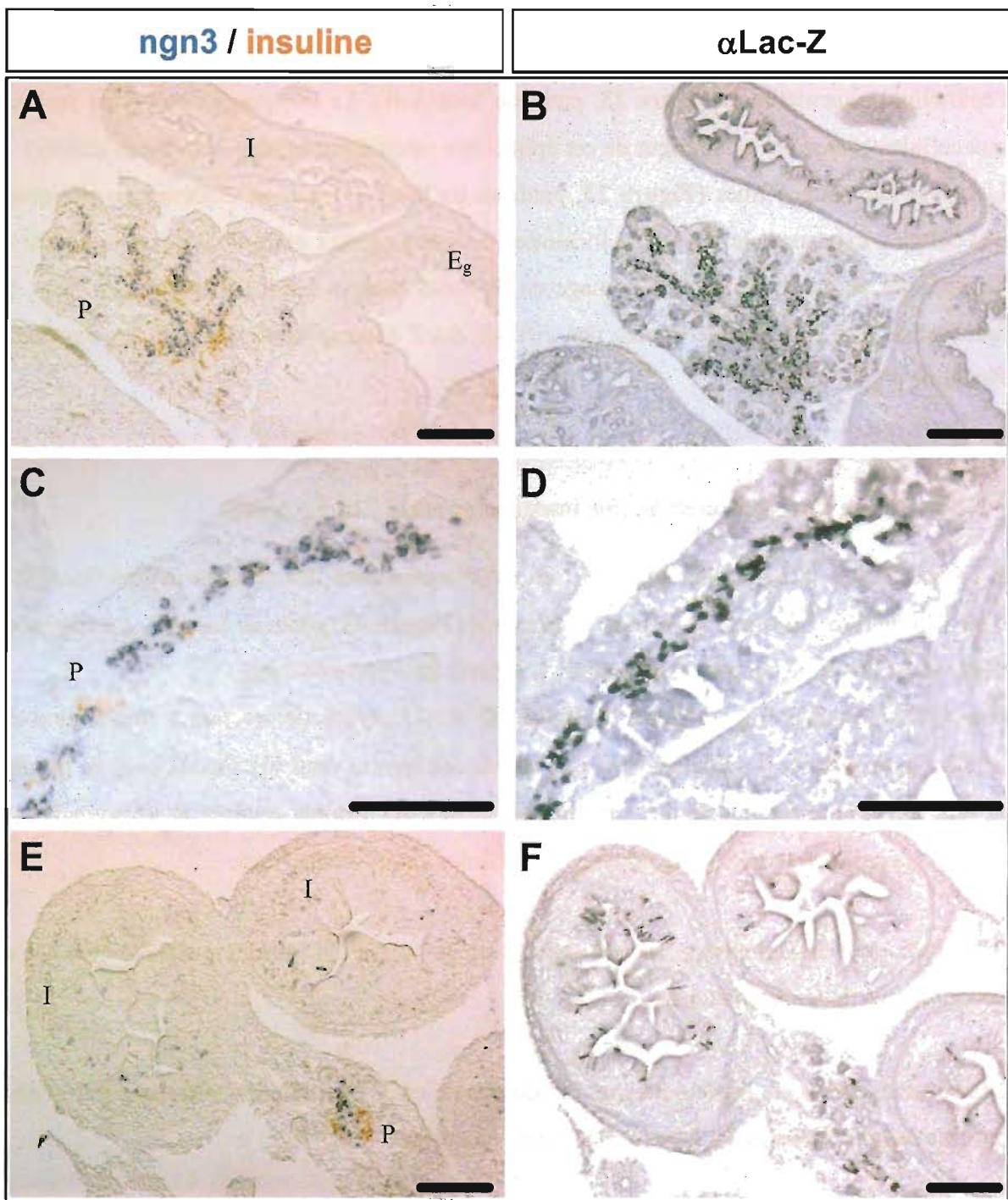
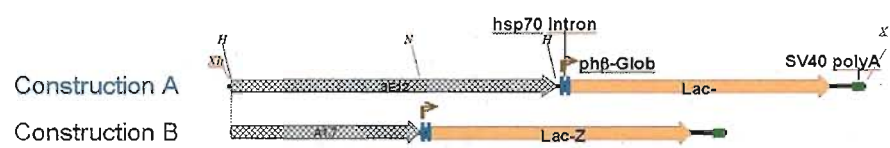
Au stade E14.5, la coloration β -gal *in toto* est détectée dans des cellules isolées, localisées dans l'épithélium intestinal (pylore et duodénum) (**Figure 23**, panneau haut/C). Le marquage observé est identique au patron d'expression intestin de *Ngn3* endogène.

L'analyse sur coupes fines (**Figure 23**, images D et E) a permis de préciser la localisation des cellules exprimant la β -galactosidase. Ces cellules se situent dans les zones discrètes bordant la lumière épithéliale intestinale, où vont se former les futures cryptes dans lesquelles se nichent les cellules souches/progéniteurs des cellules entéro-endocrines.

Il est important de signaler qu'aucune expression ectopique du transgène n'a été détectée en dehors de ces deux épithéliums.

Les résultats montrent également que la pénétrance est forte pour les territoires épithéliaux pancréatiques et intestinaux à ces stades embryonnaires.

En résumé, les expériences de transgénèse montrent que la région promotrice **A** (3,85kb) est capable de diriger l'expression de la β -gal dans les territoires endocrines entériques et pancréatiques ainsi que dans le SNC.



Eg: épithélium gastrique; *I*: intestin; *P*: pancréas

Figure 24: Comparaison des patrons d'expression de ngn3 et Lac-Z dans les territoires endocrines.

A-C-E: Analyse par double hybridation *in situ* sur coupes fines du patron d'expression de ngn3 endogène respectivement dans le pancréas [**A**: vu globale],[**C**: agrandissement] et dans l'intestin [**E**]. Le marquage est toujours strictement restreint aux précurseurs endocrines.Ces images d'HIS ngn3 (bleu) / insuline (rouge) ont été comparées avec les suivantes:

B, D, F Détection immunohistochimique (précipité noir) de la protéine Lac-Z sur coupes adjacentes (comparer A et B, C et D, E et F).

Ces photographies sont représentatives des trois embryons exprimant le transgène.

Barres d'échelles : **A-B** : 100 μ m ; **C-F** : 50 μ m.

4 Analyse des fragments de délétion de la région régulatrice de *Ngn3* : les fragments **B** et **C**

Nos résultats montrent que la région promotrice **A** (3,85pb) est capable de diriger l'expression de la β -galactosidase dans les territoires endocrines entériques et pancréatiques ainsi que dans le système nerveux central. Nous avons entrepris un découpage par dichotomie de la région de 3,85kb de "l'enhancer" *Ngn3* afin de préciser et d'isoler des « fragments minimaux » responsables de l'expression tissulaire restreinte du gène.

4.1 Recherche des éléments des fragments **B** et **C** permettant l'expression tissulaire restreinte

La première dichotomie (position *NheI*) génère un fragment de 2,2kb (construction **B**, fragment situé en 5') et de 1,8kb (construction **C**, fragment situé en 3') respectivement.

4.1.1 Expression de la cassette **B** dans le pancréas et l'intestin (E14.5)

Les résultats obtenus à E14,5 avec le fragment **B** sont très prometteurs. En effet, ce fragment est capable à lui seul de diriger une expression du transgène rapporteur à la fois dans l'intestin et dans le pancréas comme le montre la **Figure 24**. De plus, le niveau d'expression du transgène est élevé dans ces épithéliums. La correspondance entre le patron d'expression *LacZ* et le marquage des ARNm *Ngn3* a été vérifiée par marquage sur coupes adjacentes. Le marquage immuno-histochimique anti- β gal (**Figure 24 B-D-F**) est comparable à celui détecté par hybridation *in situ* pour *Ngn3*. Toutefois, la proportion des embryons transgéniques exprimant la β -gal est peu élevée (3/15) à la fois dans le pancréas et dans l'intestin mettant l'accent sur une faible pénétrance de cette construction dans ces territoires chez l'embryon à E14.5.

Il est intéressant de remarquer que dans le pancréas et dans l'intestin, le nombre de cellules β -gal⁺ est toujours supérieur au nombre de cellules exprimant *ngn3* endogène. En effet, le marquage par hybridation *in situ* de la population d'ARNm *Ngn3* représente une image figée des cellules exprimant transitoirement l'ARNm *Ngn3* en un temps donné. En revanche, la détection immuno-histochimique de la β -GAL correspond à une superposition dans le temps des cellules dans lesquelles la cassette de transgénèse est exprimée avec celles qui l'ont déjà exprimé. Ce marquage est dû à la stabilité de la protéine (demi-vie) β -GAL.

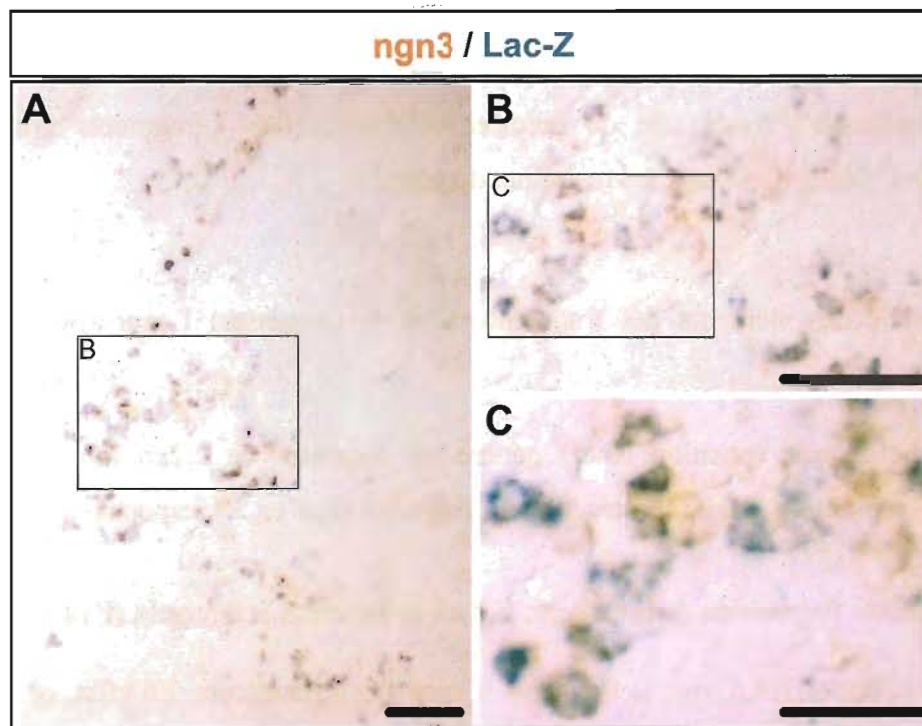
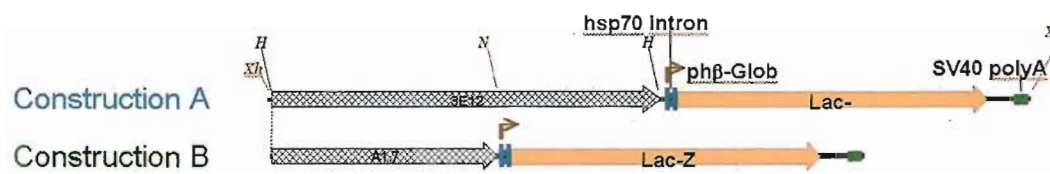


Figure 25 : Co-localisation des marqueurs ngn3 et Lac-Z au niveau pancréatique

Cette co-localisation est réalisée par double marquage ngn3 (**rouge**) / Lac-Z (**bleu**) par *hybridation in situ* sur des pancréas d'embryons transgéniques au stade E15.5. Les fenêtres **A** à **C** sont des agrandissements successifs; ils permettent de visualiser au niveau cellulaire les cellules exprimant les ARNm *Ngn3* et *LacZ*

Barres d'échelles : **A-B** : 50 μm ; **C** : 25 μm .

4.1.2 Co-localisation de l'expression des ARNm *LacZ* et *Ngn3*

Nous venons de montrer que la cassette B dirige l'expression du transgène dans le même territoire pancréatique que celui exprimant l'ARNm *Ngn3*. Nous avons alors cherché à déterminer si le fragment **B** dirige l'expression du transgène rapporteur *LacZ* dans la totalité de la population endogène *ngn3* de l'épithélium pancréatique. La **Figure 25** est un agrandissement au niveau cellulaire de la distribution des ARNm *Ngn3* (endogène) et des ARNm *LacZ* (transgène) dans le pancréas d'embryons fondateurs à E15,5 (obtenus après injection de la cassette **B**). Le patron d'expression a été obtenu par hybridation *in situ*.

Les résultats permettent de distinguer deux types de populations de cellules marquées:

- ❖ Une population de cellules doublement marquées co-exprimant les ARNm *Ngn3* et *LacZ* (bleue et rouge). La présence de ces cellules indique que le fragment **B** possède les informations transcriptionnelles nécessaires à l'expression spatiale et temporelle du transgène.
- ❖ Une seconde population de cellules n'exprimant que les ARNm *LacZ* (strictement bleue). L'explication la plus probable est que l'on co-détecte deux populations d'ARNm aux demi-vies non identiques (ce que l'on observe au niveau protéique). L'ARNm codant la protéine β -gal est probablement plus stable que celui de *Ngn3*. Cela est peut être du à l'origine bactérienne du transgène et à l'absence des séquences 3'UTR de *Ngn3* dans la construction de transgénèse.

4.1.3 Expression du transgène B dans le système nerveux central à E11.5

L'analyse des embryons transgéniques à E11,5 montre que le transgène est exprimé dans le SNC antérieur, et ce, dans une très forte proportion d'embryons. Ainsi, dans le territoire hypothalamique ventral, la pénétrance du transgène dirigé par le fragment **B** est très élevée (6 embryons fondateurs sur 7 transgéniques). Cette expression est remarquablement conservée avec le domaine d'expression de *Ngn3*.

Aucune activité β -gal n'a été détectée dans la moelle épinière ventrale des embryons (0/7 embryons transgéniques), suggérant que la région promotrice B de 2,2kb ne contient pas tous

les éléments de régulation nécessaires pour restreindre l'expression du transgène dans le tube neural postérieur (voir **Figure 26** - ci-dessous).

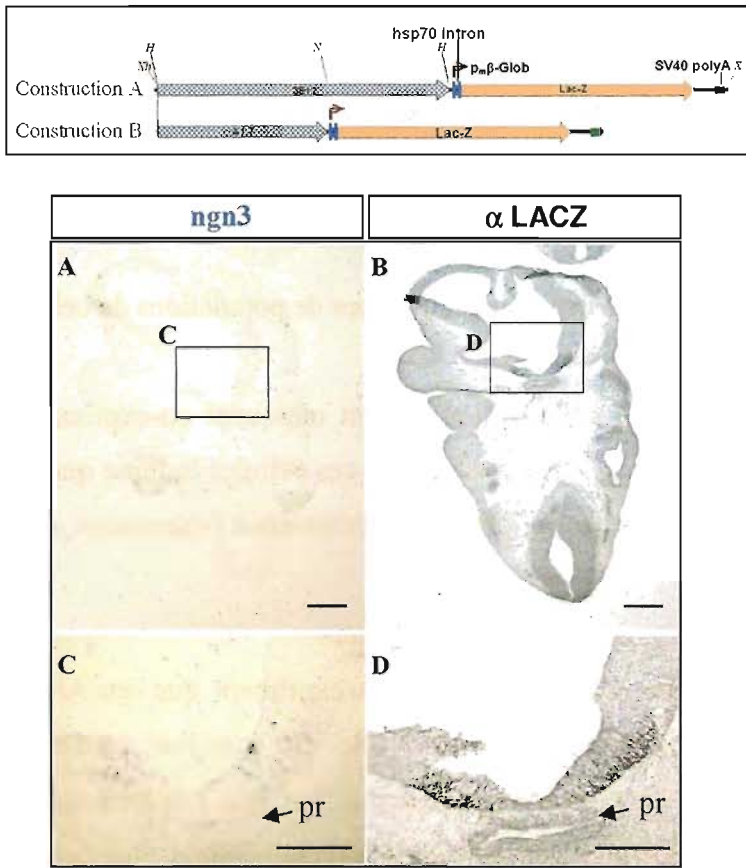


Figure 26 Patron d'expression neuronal de la construction de transgénèse B (A1.7).

A-B : La comparaison du marquage sur coupes adjacentes entre le patron d'expression endogène de *Ngn3* en **A** (par hybridation *in situ*) et celui obtenu par la détection immuno-histochimique de la β-gal en **B**, permet de vérifier la concordance de ces territoires.

C-D : agrandissements de la région hypothalamique ventrale des figures A et B respectivement. Pr = poche de rathke.

Barres d'échelles A-B : 100 μm ; C-D : 50 μm

4.1.4 Analyse de la cassette **C** par transgénèse

Sur les 26 embryons transgéniques obtenus, aucune expression du transgène n'a pu être détectée aux stades « neural » (E11.5) et « endocrines » (E14.5) respectivement. Le fragment C ne contient donc pas de séquences régulatrices capables d'activer la transcription du transgène dans les territoires endogènes de *ngn3*.

En conclusion, l'utilisation des cassettes **B** et **C** apportent de nouvelles informations concernant les éléments dirigeant le patron d'expression de *Ngn3* dans les épithéliums endocrines et dans le SNC. En effet, la région **B** est nécessaire et suffisante à diriger l'expression du transgène dans trois des quatre territoires endogènes de *ngn3* (pancréas, intestin et hypothalamus). Le fragment **C** est nécessaire mais ne permet pas à lui seul de diriger l'expression du transgène dans la moelle épinière.

4.1.5 Les autres cassettes de transgénèse (constructions de la série **D**)

Les autres constructions sont des délétions de proche en proche des fragments que nous venons d'étudier (**B** et **C**). Nous les avons regroupés sous le terme générique de série **D**. Leur clonage dans le vecteur de transgénèse est récent. Ces cassettes sont en cours d'injection.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'utilisation des outils de transgénèse a déjà démontré son efficacité dans la recherche d'éléments cis contrôlant l'expression spatio-temporelle de gènes codant des facteurs de transcription exprimés au cours du développement embryonnaire, notamment pour deux des membres de la famille des neurogénines *ngn1* et *ngn2* (Scardigli *et al.*, 2001; Simmons *et al.*, 2001; Nakada *et al.*, 2004). D'autres études ont permis de définir des fragments génomiques capables de résumer l'expression "endocrine-restreinte" du troisième membre NGN3 (Jenny *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002). Toutefois, aucune donnée n'est disponible sur les éléments responsables du patron d'expression neural de *Ngn3*.

Notre objectif est de mieux comprendre les mécanismes par lesquels le facteur bHLH NGN3 est régulé dans les différents tissus où il s'exprime. Dans cette optique, nous avons généré des animaux transgéniques exprimant le gène rapporteur *LacZ* sous contrôle de différentes régions distales du promoteur de *Ngn3*, afin de définir les séquences requises qui permettent de récapituler les caractéristiques temporelles et spatiales du patron d'expression de ce gène.

L'étude par transgénèse de l'expression d'un gène nécessite au préalable de définir : **(i)** les territoires précis d'expression du gène; **(ii)** les séquences pertinentes à tester; **(iii)** une stratégie d'étude adaptée au patron d'expression décrit.

Dans notre cas, le patron d'expression murin de *Ngn3* est bien défini et nous possédons un "enhancer" de 3,85kb de *Ngn3* (3E12) dont nous avons testé le potentiel régulateur.

1 Pertinence du fragment 3E12 testé, conservation et expression tissu-spécifique

Nous avons sélectionné le fragment 3E12 en partant de l'hypothèse que la conservation d'une séquence entre orthologues au cours de l'évolution n'est pas le fruit du hasard mais bel et bien celui d'une pression de sélection cruciale pour la fonction du gène. Par étude de génomique comparée (bioinformatique), nous avons vu au cours de ce chapitre, que le locus du gène *Ngn3* est d'une part inclus dans une région chromosomique synténique et d'autre part hétérogène du point de vue de la conservation de ses séquences régulatrices. Une région semble toutefois très conservée entre les rongeurs et l'homme et correspond au fragment 3E12 situé 1,7kb en amont du gène. Nous avons donc choisi dans un premier temps d'analyser ce fragment. De plus lorsque l'on crible cette séquence par rapport à des banques de consensus de facteurs de transcription, il apparaît qu'elle contient un bon nombre d'éléments putatifs

susceptibles de participer à la régulation de l'expression de *Ngn3* tels que certains des éléments fonctionnels HNF1, 3 et 6 et boîte E déjà décrits (Jacquemin *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Brink, 2003; Brink et Gruss, 2003). Par exemple, Jacquemin *et al.*, font état d'un fragment génomique murin de *Ngn3* de 3957bp (*Bst*uI/-4573 à *Bst*uI/-617), au sein duquel deux éléments cis-régulateur (site distal : GCATCCATAG et proximal : AAATCCATGT) capables *in vitro* de fixer le facteur HNF6 sont impliqués dans la régulation du gène *Ngn3*. Les niveaux d'expression de cette construction ont été évalués par co-transfections transitoires en présence ou non de HNF6 sur une lignée cellulaire de fibroblastes de rat et cela pour évaluer précisément l'implication de ce facteur sur l'activation du promoteur *Ngn3*.

Notre fragment d'intérêt (cassettes #A), possède d'une part une région chevauchant la partie 5' des cassettes utilisées dans cette étude (à savoir seul le motif distal de fixation de HNF6 se trouve présent dans notre cassette),(voir **Figure 27**); et d'autre part semble répondre de façon similaire en reproduisant le patron d'expression pancréatique exclusif des marqueurs endocrines des cellules matures.

Un second argument qui a guidé notre choix d'utilisation de la région 3E12 est qu'il existe des données publiées faisant état de l'étude de régions murines et humaines conservées, plus vastes englobant ou chevauchant notre fragment (Lee *et al.*, 2001; Jenny *et al.*, 2002) (voir **Figure 27**). En effet, le fragment génomique murin de 6.7kb a été décrit comme dirigeant parfaitement l'expression d'un transgène *LacZ* dans les progéniteurs endocrines intestinaux (Jenny *et al.*, 2002). Le fragment de 3,85kb (3E12) est entièrement contenu dans la région de 6,7kb étudiée par Jenny *et al.* La seconde étude présente un fragments de 5,7kb du promoteur *NEUROG3* a été décrit comme permettant l'expression tissu-spécifique (par transgénèse additive) d'un transgène dans les territoires endogènes pancréatique et intestinal de *Ngn3* (Lee *et al.*, 2001). Un des points intéressants que nous révèle cette étude, réside dans la séquence utilisée pour générer ce modèle transgénique. En effet l'originalité réside dans l'utilisation d'un fragment génomique humain. Ce fragment contient la séquence homologue à notre fragment 3E12. Les résultats décrits dans cette étude, conforte expérimentalement nos résultats d'alignement (§ 1.1.3). En effet, nous avons déterminé une très forte conservation entre les séquences murines et humaines dans cette région (66% versus 28% pour les 10kb placé en amont du gène). Cette analyse révèle donc une conservation fonctionnelle de ces éléments pour contrôler l'expression du transgène dans les territoires endocrines de *Ngn3*.

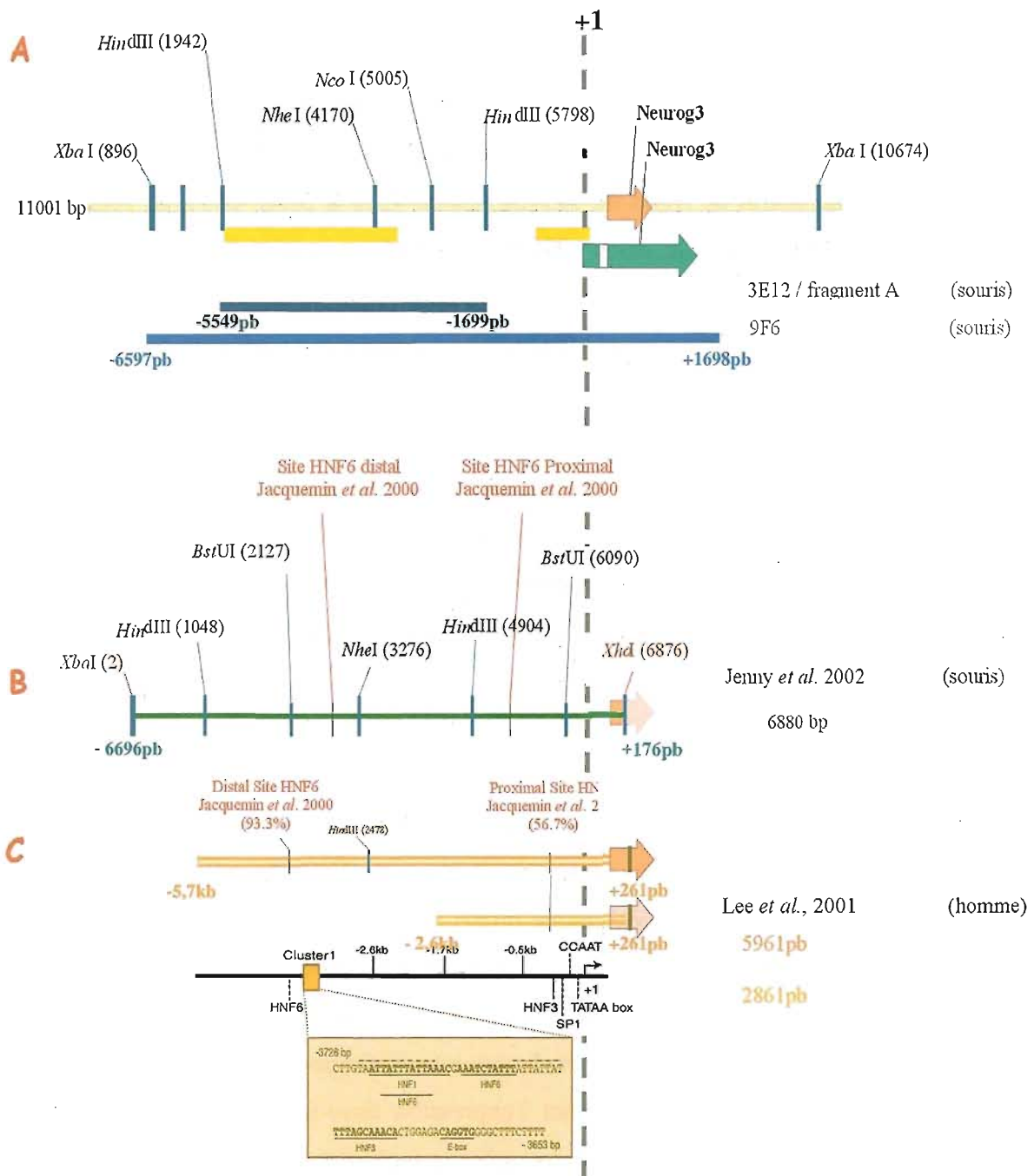


Figure 27 Vue générale des études "promotorologiques" de *ngn3*
(D'après Lee *et al.* 2001; Jenny *et al.* 2002).

A Fragments génomiques de *Ngn3* (souris). En jaune sont rappelées les régions de fortes homologies inter-espèces et en bleu la position des fragments génomiques isolés au laboratoire.

B Représentation du fragment génomique (souris) étudié par Jenny *et al.* (transgène). La position des séquences cibles testées en retard de migration sur gel par Jacquemin *et al.* est indiquée en rouge.

C Représentation du fragment génomique (humain) étudié par Lee *et al.* (transgène). La boîte "cluster 1" a fait l'objet de leur étude. Elle est pourvue de nombreux sites consensus de fixation (potentiel) tels que les HNF dont nous reparlerons plus loin dans cette discussion.

Ainsi, il semble que les deux séquences orthologues que nous venons de citer soient parfaitement capables de diriger spécifiquement les aspects tissulaires de l'expression d'une cassette de transgénèse dans le système endocrine du pancréas et de l'intestin chez la souris. La confirmation de l'identité de patron d'expression dirigé par un fragment promoteur murin ou humain est un argument supplémentaire indiquant que cette région de régulation a été conservée au cours de l'évolution et porte les éléments spécifiques de la fonction tissulaire de NGN3.

D'autres études font état de modèles murins de ciblage conditionnelle de la recombinaison CRE dirigée spécifiquement par des fragments du promoteur *Ngn3* (Gu et al 2002 ; Herrera données personnelles). Les fragments génomiques utilisés dans ces études sont tous contenus dans le fragment décrit par Jenny *et al.* (Jenny *et al.*, 2002). Ce type de modèles est généralement utilisé dans le but de tracer les populations de cellules *ngn3*⁺. L'analyse de ces souris, a permis de confirmer que NGN3 est bien un marqueur exclusif de la population précurseur de tout le lignage endocrine pancréatique.

L'ensemble de ces arguments a motivé le choix de cette séquence 3E12 qui, rappelons le, est située à 1,7kb en amont du gène qui constitue une région distale du promoteur de *Ngn3*. Il nous restait donc à définir la stratégie adéquate pour étudier ce fragment avec le souci d'être compatible avec le patron d'expression de *Ngn3*.

2 Stratégie d'étude : *in vitro* ou *in vivo*?

Nous avons généré des cassettes de transgénèse dans lesquelles le gène rapporteur *LacZ* est sous le contrôle de différents fragments de la région 3E12. L'expression du transgène *LacZ* peut être analysée **(i)** *in vitro* dans des systèmes cellulaires (par transfections transitoires) ; **(ii)** *in vivo* dans des modèles murins (par transgénèse).

Nous disposons d'un système cellulaire exprimant des ARNm *Ngn3*. Les constructions (A à D) ont été transfectées sur une lignée de cellules neuroépithéliales immortalisées par l'expression d'une version thermosensible TΔt de l'antigène T de SV40 (lignée B3, fournie par J. Nardelli et Y. Hazhouz (Hazhouz, 2002; Nardelli *et al.*, 2003). L'intérêt d'utiliser une telle lignée est qu'elle a été établie à la suite de la mise en culture du neuroépithélium de la moelle épinière thoracique et cervicale au stade E10.5 (stade auquel l'ARNm *Ngn3* est exprimé dans la moelle épinière). Les résultats des transfections montrent que toutes les constructions sont

capables de diriger l'expression du transgène *LacZ* dans cette lignée cellulaire. Le niveau d'expression des transgènes détecté par coloration *in toto* est élevé (données personnelles). Des résultats similaires ont été observés par l'équipe de German (Lee *et al.*, 2001), et ce dans plusieurs types cellulaires exprimant *ngn3* (cellules endocrines ou fibroblastes). Toutefois, les résultats obtenus en utilisant ces fragments ont conduit Lee *et al.* (2001) à conclure que l'expression des transgènes qu'ils ont observé *in vitro* est non spécifique et reflète la différence qu'il peut exister entre un système cellulaire (cellules transformées) et un modèle *in vivo*. Il est donc probable que l'expression des différents transgènes que nous détectons dans la lignée de cellules immortalisées soit également non spécifique. Cette absence de spécificité peut s'expliquer par le fait que les cellules utilisées ne sont pas parfaitement représentatives des cellules neuroépithéliales *ngn3*⁺ dans leur contexte natif. Les modifications engendrées par l'établissement de la lignée ne permettent peut être plus de rendre compte des éléments de réponses responsables de l'expression tissulaire restreinte de *Ngn3*.

Au vu des conclusions des travaux cités ci-dessus, nous nous sommes tournés vers les outils de transgénèse qui paraissent plus appropriés pour étudier l'expression « tissu-spécifique » de *Ngn3*.

3 Transgénèse : stratégie, avantages et limites

3.1 Choix du vecteur de transgénèse

Le vecteur de transgénèse BGZ40 présente de nombreux avantages. Ce vecteur contient le promoteur minimal de la β -Globine qui garantit un bon niveau d'expression du gène rapporteur codant la β -gal. De plus, des travaux font état d'une très faible expression ectopique du transgène *LacZ* lorsqu'il est placé sous contrôle de ce promoteur minimal (Choi *et al.*, 1991; Yee et Rigby, 1993; Ghislain *et al.*, 2002; Ghislain *et al.*, 2003; Chomette *et al.*, 2006). Le choix du gène *LacZ* comme gène rapporteur a été motivé par le fait que la protéine β -gal est connue pour être stable (voir résultats); mais aussi par la possibilité de pouvoir comparer le niveau d'expression de chacune des constructions dans un même tissu par dosage de l'activité β -gal. De plus, l'adressage cytosolique de la protéine transgénique permet de visualiser les prolongements des cellules neurales, permettant de suivre les projections des cellules exprimant *Ngn3* (voir résultats).

3.2 Avantages : embryons jetables ou lignées établies?

Avant de débiter cette étude, nous nous sommes demandés s'il fallait systématiquement générer des lignées transgéniques ou si en tenant compte du patron embryonnaire de *Ngn3*, il ne serait pas plus informatif d'adopter une stratégie "embryons fondateurs" ou "embryons jetables".

L'approche par embryons jetables permet :

- de cribler les différentes cassettes transgéniques plus rapidement puisque les embryons sont directement prélevés après réimplantation aux stades embryonnaires d'intérêts.
- de réaliser plusieurs séries d'injections et de collecter un plus grand nombre d'embryons transgéniques indépendants.
- de confirmer qu'un patron d'expression itératif est obtenu indépendamment du nombre de copies.

Cependant cette approche a aussi une limite, puisque les stades embryonnaires étudiés sont fixés. La fenêtre d'observation de l'expression du transgène est donc "figée" à un moment précis du développement.

Les lignées établies permettent:

- d'exclure une expression ectopique ou différée à des stades embryonnaires différents,
- d'obtenir des animaux à des stades de développement plus tardifs ce qui au vue du patron d'expression de *Ngn3*, dans les cryptes intestinales et le tube séminifère chez le jeune sexuellement immature (P1 à P21) ou chez l'adulte, peut être important.
- de s'affranchir du mosaïcisme des fondateurs inhérent à la technique de transgénèse. En établissant des lignées, les embryons analysés ne sont jamais mosaïques.

3.3 Limites de la transgénèse additive

La technique de transgénèse "classique" ou additive comporte toutefois des limites.

Par exemple, elle ne permet pas de contrôler ni le nombre de copies du transgène intégré, ni le site d'intégration. L'expression du transgène se retrouve donc directement sous l'influence de l'environnement chromatinien dans lequel il s'est intégré. Lorsqu'une forte variabilité de l'expression pour une même construction est observée, on parle alors "d'effet de position". Ce

phénomène peut engendrer des profils d'expressions atypiques, ectopiques voire létaux et par conséquent conduire à l'observation de résultats erronés.

Une autre limitation de cette technique est la possibilité d'obtenir des animaux fondateurs mosaïques. Bien que l'injection d'ADN soit effectuée à un stade très précoce (E0,5), environ 30% des fondateurs obtenus sont estimés "mosaïques" (Whitelaw et al, 1993 ; Wall, 2001). Ce résultat s'explique soit par l'absence même du transgène dans certains lignages cellulaires, soit par l'extinction ou la non expression du transgène dans certains types cellulaires.

Malgré ces limitations, la transgénèse reste l'outil quasi-incontournable et généralement utilisé pour étudier des séquences régulatrices contrôlant l'expression tissulaire restreinte d'un gène.

4 Bilan de l'étude des différentes constructions de transgénèse

4.1 Patron d'expression du transgène 3E12 (fragment A)

Cette étude nous a permis de tester le potentiel de régulation "tissu-spécifique" de l'enhancer de 3,8kb ([#A] 3E12-3,85kb) de la région distale du promoteur de *Ngn3* par transgénèse.

Nos données montrent que dans un contexte hétérologue le fragment [#A], dirige l'expression du gène rapporteur *LacZ* exclusivement dans les territoires d'expression du gène endogène *Ngn3*. En effet, le transgène *LacZ* est détecté dans le pancréas et dans la partie intestinale du tube digestif des embryons aux stades E14.5 et E15.5. Les marquages obtenus sont identiques à ceux publiés par (Jenny et al., 2002).

Nos résultats apportent de nouvelles informations sur la régulation de l'expression de *Ngn3* dans le système nerveux. En effet, l'étude du patron d'expression de *LacZ* dans le SNC démontre que la région de 3,8kb est nécessaire et suffisante pour mimer l'expression endogène de *Ngn3* dans le tube neural postérieur et l'hypothalamus ventral aux stades embryonnaires E10.5 et E11.5. Toutefois, cette région n'est pas capable à elle seule de réprimer l'expression du transgène dans des régions qui n'expriment pas *Ngn3* de façon endogène. En effet, une expression ectopique a été mise en évidence dans la région du pédoncule optique, la notochorde et le rhombencéphale des embryons provenant des deux lignées établies. A ce stade de l'étude, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'ectopisme du transgène. Il est possible que l'expression non spécifique observée soit due à l'absence dans notre fragment, d'un élément cis-régulateur capable de réprimer l'expression de *Ngn3* dans les territoires ectopiques. Il est surprenant de voir que les territoires présentant une expression ectopique du transgène sont localisés dans des régions ventrales qui expriment directement

Sonic Hedgehog SHH (notochorde) ou qui sont sous l'influence de fortes concentrations de SHH (pédoncule optique). Cette observation, laisse supposer la présence dans le fragment génomique A, d'éléments de réponse aux morphogènes responsables de l'organisation dorso-ventrale des territoires nerveux. Nous avons donc recherché les boîtes cis-régulatrices présentant le motif consensus TGGGTGGTC, caractéristique de la fixation des effecteurs de la voie SHH. Parmi ces effecteurs, nous pouvons citer les facteurs Gli/Zic et plus récemment NKL (neuronal kruppel like protéine) de la famille Kruppel à doigts de zinc (C2H2). Ces facteurs sont les homologues chez les mammifères de Ci, *cubitus interruptus* de la drosophile (Kissinger *et al.*, 1990; Vortkamp *et al.*, 1995; Ruiz i Altaba, 1998; Lamar *et al.*, 2001). Ils jouent un rôle dans la médiation du signal SHH dans le SNC via la voie de transduction Patched-Smoothed, initialement identifiée chez la drosophile et très fortement conservée chez les mammifères. Il s'avère que ce motif se trouve absent du fragment 3E12 mais il est présent dans la région 3' du fragment de 8,3kb (9F6). Toutefois, ce type d'expression ectopique n'a pas été observé avec le fragment B. Il est donc possible que la région du fragment A qui n'est pas comprise dans le fragment B contienne des éléments répondant à un morphogène comme SHH.

Une autre hypothèse que nous ne pouvons pas écarter est directement inhérente à la technique de transgénèse (effet de position) ou à la cassette de transgénèse (promoteur composite de la β -globine). En effet, nos résultats pour cette construction #A (lignées établies) dans le SNC, montrent une variabilité d'expression pour les trois lignées établies. Pour palier à cette variabilité, il est nécessaire d'augmenter le nombre d'embryons fondateurs étudiés pour valider statistiquement ou non la fréquence de répartition des territoires ectopiques observés. Trois nouvelles lignées transgéniques obtenues après micro injection de ce même fragment A, sont en cours d'analyse.

4.2 Recherche des éléments responsables de l'expression "tissu-spécifique" de *Ngn3*

Nous avons généré à partir du fragment génomique A, deux fragments de 2.2 kb ([#B]) et de 1.6 kb ([#C]) respectivement. Les fragments B et C contiennent respectivement la région 5' et 3' du fragment A.

Les résultats collectés pour le fragment [#B] sont intéressants puisqu'ils montrent que ce fragment est capable de diriger l'expression du transgène *LacZ* dans une partie des territoires endogènes de *Ngn3* (SNC antérieur et épithéliums pancréatiques et intestinaux). Au niveau du patron "endocrine" et "SNC antérieur" (hypothalamus), les cassettes [#A] et [#B] se

comportent de façon identique. Le fragment **B** est donc nécessaire et suffisant pour diriger l'expression tissulaire du transgène au niveau de l'hypothalamus (forte pénétrance 6/7) et du système endocrine digestif (faible pénétrance pour ces tissus 3/15). Ce premier découpage a permis de restreindre à 2,2kb la région responsable de l'expression tissu-spécifique de *Ngn3* dans les domaines hypothalamiques ventral, pancréatiques et intestinaux.

De plus, la région délétée entre ces deux constructions, soit la région **C** est nécessaire à l'expression tissulaire de *Ngn3* dans la moelle épinière ventrale puisque l'expression dans ce territoire est abolie en son absence. En revanche, l'analyse de la cassette **C** montre que la région de 1,6kb contenu en 3' du fragment **A** n'est pas capable de diriger seule l'expression du transgène dans le tube neural postérieur. Ainsi, la région **C**, est nécessaire mais pas suffisante à diriger l'expression tissulaire restreinte dans la moelle épinière.

En conclusion, nous n'avons pas pu séparer les éléments dirigeant spécifiquement les aspects tissulaires restreints neuronaux et endocriniens dans la séquence régulatrice testée. Cependant, la forte pénétrance uniquement obtenue pour le territoire hypothalamique semble être un bon indice nous permettant d'isoler dans les futures cassettes testées, les éléments nécessaires et suffisants pour cette région d'expression.

5 Existe-il une conservation des régions régulatrices des trois neurogénines?

L'analyse des séquences promotrices distales de *Ngn1* et 2 ont été conduites par transgénèse. Elles ont permis de démontrer qu'il existait dans les régions régulatrices de *ngn1* des éléments distincts responsables de l'expression dans les différents sous territoires d'expression de *ngn1* (Nakada et al 2004). En revanche, pour *Ngn2* la plupart des études se sont attachées à évaluer le potentiel de régions distales du promoteur à diriger l'expression d'un gène rapporteur spécifiquement dans le tube neural soit ventral soit dorsal (Scardigli *et al.*, 2001). Il est raisonnable de penser que *Ngn2* possède des "enhancer" distincts pour l'expression dorsale et ventrale, permettant de répondre directement ou indirectement aux signaux antagonistes BMP ou SHH. Dans le domaine ventral du tube neural, deux candidats Sox et Hox ont été proposés pour participer au contrôle de l'expression de *ngn2*. Leurs séquences consensus de fixation sont présentes sur les régions régulatrices localisées en 3' du gène et sont capables de diriger spécifiquement l'expression de *ngn2* ventralement dans le tube neural (Simmons *et al.*, 2001). Ces deux candidats apparaissent intéressants à étudier car ils sont exprimés dans le tube neural ventral (Briscoe *et al.*, 2000) et ils sont notamment impliqués chez le xénope dans la régulation du gène *X-ngnr-1* (Kishi *et al.*, 2000).

La comparaison des séquences orthologues *Ngn1* et 2 notamment entre mammifères et poisson zèbre, mettent à jour de courts motifs conservés qui compte-tenu de l'éloignement en termes d'évolution (divergence) apparaissent potentiellement importants pour le maintien de la spécificité d'expression du gène (Murray *et al.*, 2000; Gowan *et al.*, 2001; Nakada *et al.*, 2004).

Nous avons recherché par alignement de séquences, l'existence de similitudes entre les régions génomiques de *ngn1*, 2 et 3. L'alignement global des contigs des régions génomiques située en 5' du gène des trois neurogénines *ngn1*, 2, 3 (respectivement sur les chromosomes 3, 13 et 10) indique de faibles similitudes pour la région 5' en faveur du couple *ngn1* et 3. Cependant, ils n'ont pas permis d'établir clairement de domaines conservés connus chez la souris. Seules des répétitions (GT)_n et le consensus bHLH (régions codantes) ont été détectés. Pourtant un nouveau motif GCTTTTG dont l'élément trans n'est pas décrit sur les banques de matrices consensus, a été décrit pour *Ngn2* (fragment 5' et 3' dirigeant l'expression dans tube neural dorsal et ventral). Ce motif est aussi présent dans la séquence promotrice de *Ngn3*. En revanche, du côté 3', Simmons *et al.* (2001) ont déterminé qu'il existait un domaine responsable de l'expression ventrale de *ngn2* possédant une forte conservation inter-orthologues (91% homme/souris ; et 86% souris/poulet) et de surcroît 50% de similitude avec la région 3' du gène neurogénine 1 (Simmons *et al.*, 2001). Il serait intéressant de rechercher ces éléments dans les régions régulatrices de *Ngn3*.

Ainsi, l'analyse des régions régulatrices des trois membres de la famille *ngns* permet de mettre en évidence une organisation commune.

En effet, pour ces trois facteurs, la région proximale (environ 4kb en amont de l'ATG) contient les éléments du promoteur minimal et ne semble pas posséder de motifs cruciaux responsables de l'expression tissulaire différentielle de chacun d'eux (Murray *et al.*, 2000; Gowan *et al.*, 2001; Nakada *et al.*, 2004). Les études menées sur les régions promotrices de *ngn1*, 2 ou 3 ne mentionnent pas de telles séquences dans cette région de 3 à 4 kb du promoteur proximal.

En revanche, pour *Ngn1*, 2 et 3, les séquences distales contenues dans les 3-4kb en amont du promoteur proximal comportent des fragments génomiques nécessaires et suffisants pour diriger, dans un contexte hétérologue, l'expression spatiale de ces bHLH (Scardigli *et al.*, 2001; Simmons *et al.*, 2001; Nakada *et al.*, 2004).

Enfin, les régions en aval des séquences codantes de *Ngn1* et 2 participent aussi à l'expression tissu-spécifiques de ces deux facteurs dans le tube neural. Il serait intéressant de tester les régions en aval des séquences codantes de *Ngn3*.

6 Perspectives

Les résultats que nous venons de présenter dans ce chapitre, ainsi que les données de génomique comparée disponibles ouvrent de nombreuses perspectives à ce projet.

Tout d'abord, nous sommes en cours d'obtention de nouvelles lignées établies pour la première de nos constructions (**A**). Cette première perspective, nous permettra de déterminer dans un premier temps le niveau de variabilité d'expression du transgène et de le corrélérer ou non avec le nombre de copies intégrées. Il nous est possible de quantifier et de comparer ces niveaux d'expression par le dosage de l'activité β pour un même territoire d'expression entre les différentes lignées. Le nombre de copies intégrées peut être obtenu par des expériences de "southern blot" ou par PCR quantitative (Ballester *et al.*, 2004; Yun *et al.*, 2006). L'analyse d'un plus grand échantillonnage de fondateurs indépendants, permettra de déterminer si les différents territoires d'expression ectopiques se trouvent être dépendants du fragment utilisé dans cette cassette de transgénèse. Dans le cas où ils auraient une relevance statistique, nous évaluerons les différentes hypothèses que nous avons émises dans la discussion ci-dessus. Pour cela, il faudrait compléter l'étude de ces nouvelles lignées par l'obtention d'embryons fondateurs permettant d'établir la pénétrance du transgène dans chacun des territoires ectopiques. La recherche d'éléments de réponse aux signaux morphogènes que nous avons entreprise suite à nos premières observations, indique la présence de tels éléments dans le fragment 9F6. Nous pourrions ainsi confirmer l'implication de tels éléments en transgénèse additive par injection de la région régulatrice du clone 9F6 présentant cet élément *cis* natif, muté ou délété.

Le même type d'approche "élément cis-candidat" sera présenté à la fin de ces perspectives car il s'agit de données préliminaires très récentes qu'il m'est paru important d'ajouter à ce manuscrit.

Une seconde priorité de nos perspectives consiste à revoir à la lumière de nos résultats la pertinence d'injecter les cassettes contenant les fragments délétés (constructions **D**). En effet,

les fragments utilisés dans cette études (fragments **B** et **C**) sont associés à une pénétrance faible voir nulle à l'exception du territoire hypothalamique ventral (6/7) pour le fragment **B**.

- ❖ Ainsi pour le territoire hypothalamique, l'utilisation des constructions **D** (délétions du fragment **B**) telles que nous les avons conçues peuvent être injectées afin de délimiter une région de taille plus restreinte (inférieure à 2,2kb) permettant de rendre compte de l'expression spécifiquement dans ce territoire du SNC antérieur. Ces délétions sont en cours d'étude. Nous avons donc privilégié dans un premier temps la stratégie d'obtention d'embryons fondateurs au stade embryonnaire E11.5.
- ❖ En revanche pour les autres territoires: le neuroépithélium ventral, le pancréas et l'intestin : la pénétrance de ces régions est faible voir nulle. L'étude des cassettes de délétion pour les stades tardifs ne semble pas être une priorité. De plus nous savons qu'en 3' du site NheI se trouvent quelques centaines de paires de base encore fortement conservées qu'il serait nécessaire d'ajouter dans chacune des constructions de cette étude afin de déterminer si la pénétrance due à cet ajout n'est pas améliorée. Cette partie est en cours de réalisation.

Au vu de l'importance des séquences régulatrices situées en 3' des régions codantes des gènes *Ngn1* et 2 pour l'adressage de leur propre expression dans la moelle épinière (ventrale versus dorsale), il nous paraît évident que cette région 3' est une piste à exploiter. Comme nous possédons un fragment de cette région (1,5kb dans le clone 9F6), une perspective à court terme serait de sous-cloner ce fragment dans le vecteur BGZ40 et de le tester en transgénèse. Il serait intéressant de prévoir des cassettes similaires contenant certains de ces éléments mutés (sélectionnés sur des critères d'homologie avec les séquences *Ngn1* et 2).

Les développements récents dans le domaine de la génomique fonctionnelle ont provoqué une véritable explosion de la quantité d'informations biologiques disponibles au sein des banques de données publiques. Nous croyons fortement que pour notre projet, ces outils sont des atouts précieux nous permettant de nous guider dans la sélection des futurs fragments à tester par exemple: **(i)** en les criblant par les banques de données (TransFac ; JASPAR ou MatBase) contenant les séquences consensus de fixation de facteurs trans potentiellement intéressants pour la régulation de *Ngn3* ou bien **(ii)** en recherchant des modules de régulations communs parmi les gènes co-modulés ou impliqués dans les mêmes processus développementaux.

La comparaison à l'échelle inter-espèce nous permettrait d'apporter plus de valeur quant à la pertinence des éléments "cis" à étudier. C'est d'ailleurs en effectuant ce type de comparaison et d'alignement phylogénétique que nous avons mis en évidence une forte conservation de la région contenant les 3,85kb de notre élément régulateur de *Ngn3*.

Très récemment, nous avons débuté une approche bioinformatique de notre fragment d'intérêt afin de sélectionner des motifs consensus dont nous aimerions évaluer par transgénèse l'implication dans la régulation de l'expression du gène *ngn3*.

Pour ce faire nous avons utilisé plusieurs interfaces nous permettant de cribler à l'aide de notre séquence, des banques de motifs conservés. Nous avons sélectionné un serveur dont nous avons déjà parlé, génomatix (application MatInspector), dont nous avons évalué la pertinence en recherchant les motifs cis déjà décrits dans la littérature. Pour les résultats, le score seuil utilisé est de 0,85. Nous avons donc vérifié la présence des boîtes fonctionnelles E, HNF1, 3 et 6 déjà décrites (Jacquemin *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Brink, 2003; Brink et Gruss, 2003) (voir **Figure 28 A**). Une synthèse des résultats de notre criblage est représentée sur la **Figure 28 B/C**. Seuls certains des sites de liaison des facteurs de transcription connus comme étant présents dans les territoires d'expression de *ngn3* tels que les éléments à homéodomaine NKX par exemple sont représentés (nous reparlerons dans la troisième partie des résultats).

A

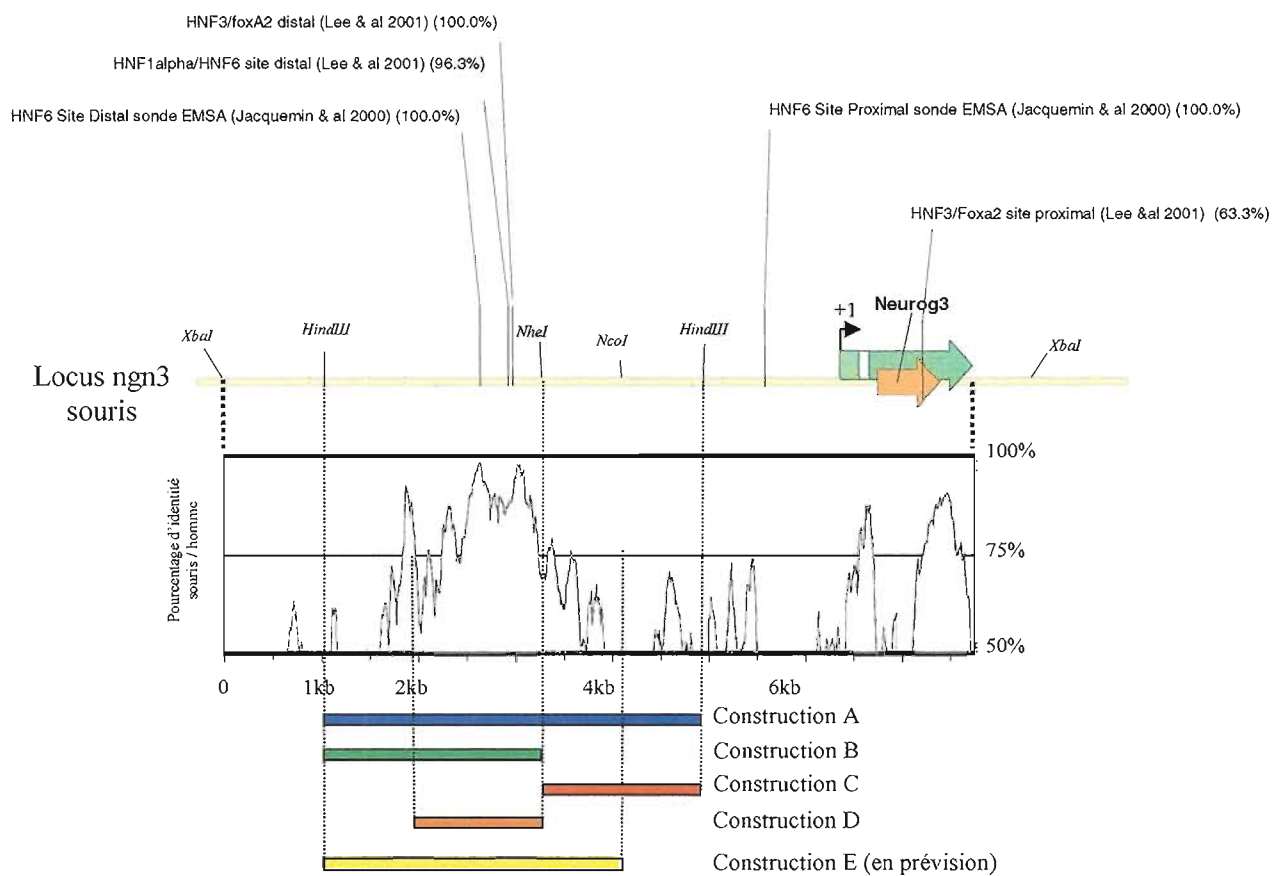
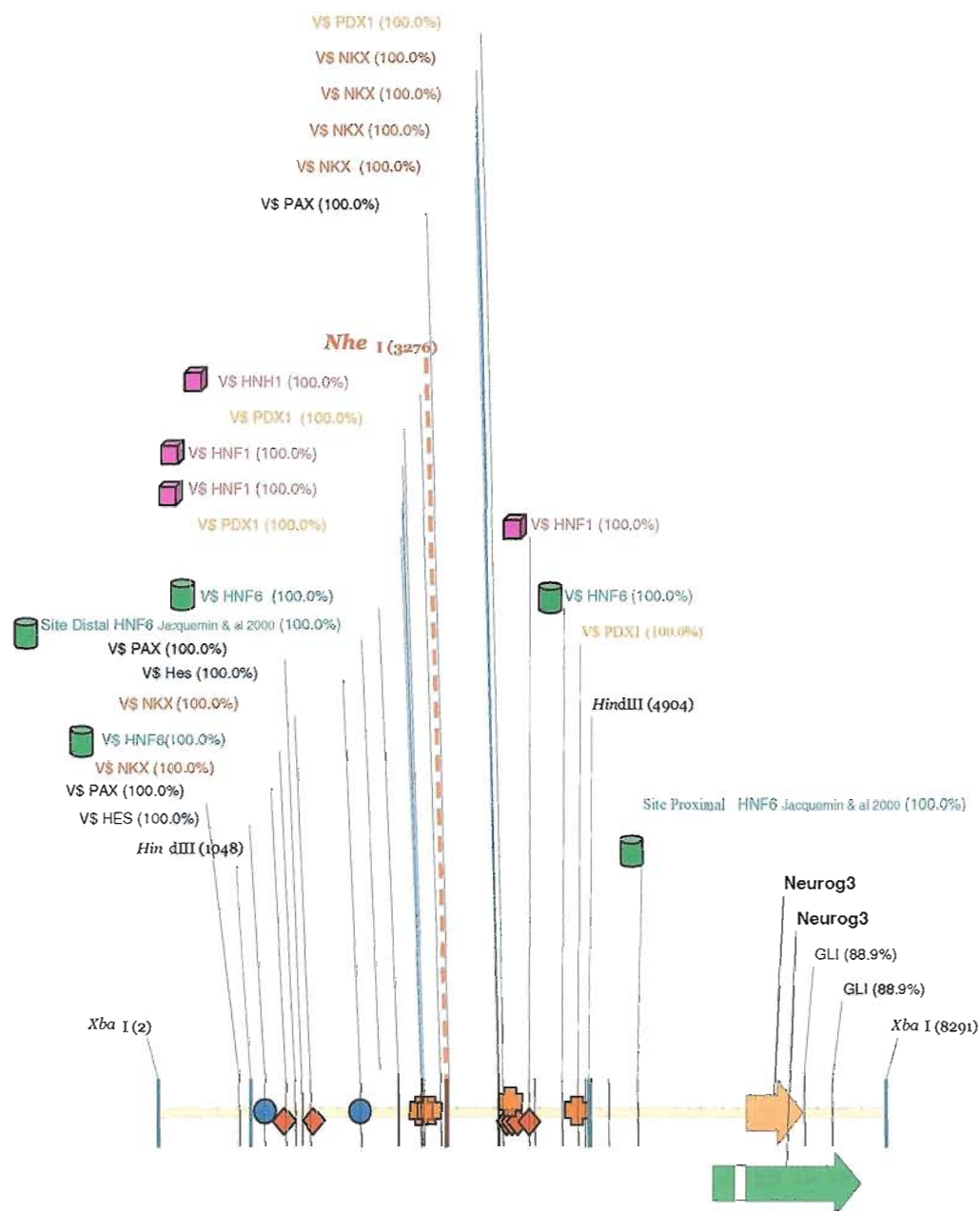


Figure 28 **A** Cartographie de sites de liaison de facteurs de transcription décrit sur la région distale du promoteur de *ngn3*.

(D'après Jacquemin et al 2000 et Lee et al 2001)

Représentation graphique des éléments cis décrit par Lee et al (2001/étude réalisée chez l'homme) et Jacquemin et al (2000/étude réalisée chez la souris) sur la région promotrice de *ngn3*. Les pourcentages entre parenthèses indiquent le degré d'homologie entre les motifs étudiés et la séquence promotrice de souris.



Famille de Motifs	V\$HNF1 Hépatocytaires	V\$HNF6 Hépatocytaires	V\$FOXA2 Hépatocytaires	V\$NKX Hépatocytaires	V\$NEUR NeuroD/NGN	V\$PAX4/6	V\$PDX1/Islet 1&2	V\$HES	V\$GLI
Exemples de facteurs cis	Tcf1 Tcf2	HNF6	FOXA1/HNF3α, FOXA2/HNF3β ; FOXA3/HNF3γ	NKX 2.1, 2.2, 6.1, 6.2	NeuroD Neurog1, 2, 3, Olig2	Pax-4 Pax-6	Pdx1 Islet 1 Islet 2	HES 1-6	Gli 1, 2, 3 Zic 1, 2, 3
# 9F6	7	5	18	27	7	6	5	5	10
# 3E12 / A	4	3	12	6	6	3	4	2	7
# A1°7 / B	3	2	10	2	5	2	2	2	4
# A2°6 / C	3	1	6	0	3	1	2	1	3
# 3°12 / D	1	1	2	4	1	1	2	0	3

Figure 28 B / C Cartographie de sites de liaison de facteurs de transcription putatif sur la région distal du promoteur de *ngn3*.
Obtenu par criblage *in silico* Tfssearch et MatInspector.

RESULTATS 2

RESULTAT 2 - CAPACITE DE CIBLAGE DES PROGENITEURS ENDOCRINES DU PANCREAS

OBJECTIF, CONTRAINTES ET STRATEGIE

L'objectif de ce travail est de démontrer la capacité d'infecter efficacement les progéniteurs pancréatiques tout en ayant une transduction du transgène effective uniquement dans les cellules différenciées, à savoir ici les cellules β matures.

Les contraintes étaient d'avoir accès aux progéniteurs des tissus du pancréas embryonnaire, aussi bien chez les rongeurs que chez l'humain.

Notre stratégie est totalement innovante dans le pancréas car elle cible les précurseurs de cellules matures de sorte que le transgène soit exprimé de façon constitutive et restreinte à la cellule mature. Pour ce faire nous avons utilisé une nouvelle génération de lentivirus pan-topiques.

La présentation de ce travail se divisera en 5 parties : Les modèles expérimentaux ; la sélection du mode de transfert de gène ; la recherche des conditions optimales de transduction ; la capacité à cibler des progéniteurs ; enfin les perspectives envisageables à la suite de cette étude.

1 Les modèles expérimentaux

Le groupe de R. Scharfmann a développé plusieurs modèles expérimentaux permettant de mimer *in vitro* et *ex vivo* la différenciation et la morphogenèse du pancréas à partir d'explants pancréatiques embryonnaires murins ou humains. Compte-tenu de la rareté d'obtention des tissus embryonnaires humains, nous avons opté pour une mise au point sur des tissus murins avant d'envisager une application au pancréas embryonnaire humain.

Ces modèles ont l'avantage de nous donner accès à un tissu embryonnaire riche en cellules progénitrices que l'on souhaite cibler.

1.1 Modèle *ex vivo* par xénogreffe

Dans le cadre de cette étude, la xénogreffe consiste à greffer des tissus embryonnaires sous la capsule rénale de souris immuno-incompétentes (*scid*). Ce modèle a déjà été décrit comme

permettant le développement d'un grand nombre de tissus, tels que le thymus de rongeur, les cellules adrénocorticales bovines et les ébauches pancréatiques embryonnaires et fœtales humaines (Hoffmann *et al.*, 1992; Hayek et Beattie, 1997; Thomas *et al.*, 1997; Castaing *et al.*, 2001). Il permet par exemple à un pancréas embryonnaire humain immature de parachever son développement pour donner un greffon différencié et fonctionnel, extrêmement riche en cellules endocrines et exocrines matures et organisé comme un pancréas adulte (Castaing *et al.*, 2001; Castaing *et al.*, 2005b).

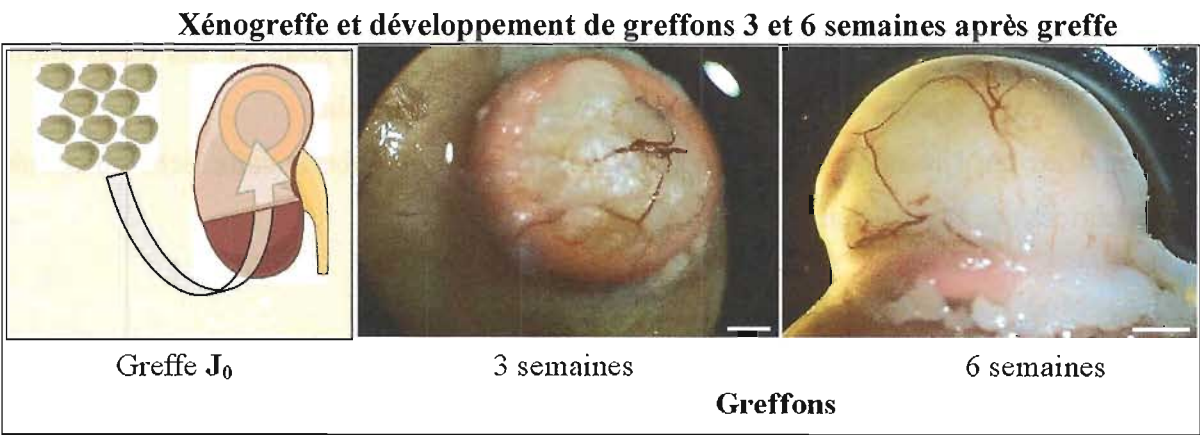
Afin de ne pas être tributaire de l'attente d'obtention des tissus humains, nous avons adapté cette technique à du tissu pancréatique embryonnaire de rat (Castaing *et al.*, 2005b). Sur ces derniers, nous avons mis au point des protocoles de transduction efficace. Les seules modifications apportées sont inhérentes :

- (i) À la taille des tissus greffés/au nombre d'ébauches par souris greffée

Les ébauches murines étant de petites tailles (0,01 mm³) par rapport au tissu pancréatique embryonnaire humain (100 à 500 plus gros); il est nécessaire d'utiliser un anneau de silicone (3,5mm) afin de garder les ébauches dans une zone confinée, étanche, comprimée entre le rein et la capsule. Les bourgeons sont déposés au centre de l'anneau avec une seringue Hamilton, soit 10 à 20 par souris greffée.

- (ii) Au temps de développement rapide du tissu murin greffé

Nous avons démontré dans cette étude que la différenciation du tissu greffé est obtenue dès 7 jours. A 3 semaines, le greffon est complètement différencié, vascularisé et fonctionnelle. Au delà d'un mois, une hyperplasie du greffon est observable comme le montre la **figure ci-dessous**. En comparaison le tissu humain nécessite un temps de greffe beaucoup plus long pour un développement équivalent (2 à 3 mois minimum).



Nous avons vérifié en terme de différenciation, le développement des greffons par marquages immuno-histologiques. La caractérisation de ce modèle montre après greffe que le tissu immature initialement greffé comporte:

- ❖ des cellules exocrines exprimant la carboxypeptidase A (CPA). Ces cellules sont agencées en structure rappelant celle des acini.
- ❖ des cellules exprimant l'insuline et le glucagon. Leurs localisations et leurs organisations rappellent l'organisation endocrine des îlots de Langerhans.

Ces résultats sont illustrés dans la figure 2 de notre article (voir § Development of rat embryonic pancreases engrafted in mice-figure 2) (Castaing *et al.*, 2005b).

De plus, pour vérifier la fonctionnalité de ces structures, des dosages radio-immunologiques (RIA) de l'insuline ont été effectués. Ils montrent qu'au cours de la greffe, on multiplie par plus de 250 fois la quantité d'insuline après un développement de 7 jours de la xénogreffe. Les taux d'insuline mesurés corroborent les données immuno-histologiques.

1.2 Modèle *in vitro* de culture organotypique en matrice de collagène

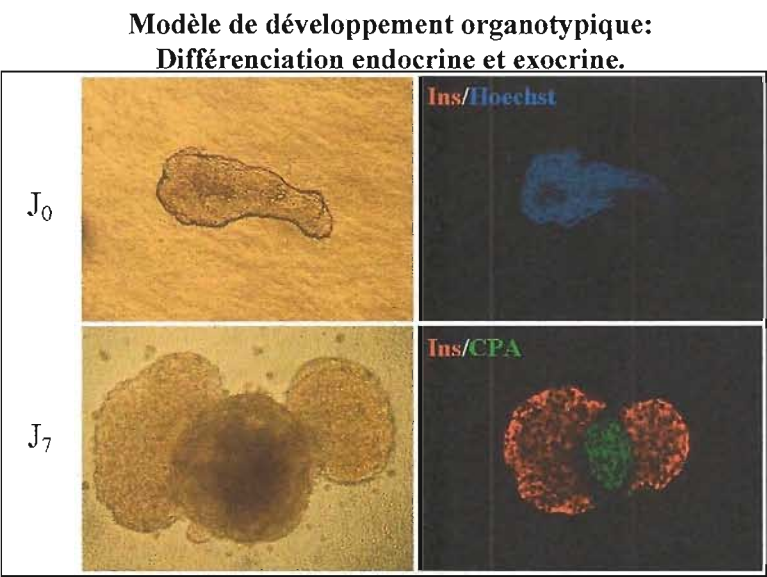
Le second modèle *in vitro* mis au point depuis plusieurs années dans le laboratoire de Raphaël Scharfmann permet de mimer les étapes de prolifération et de différenciation du pancréas embryonnaire chez le rat (Leduque *et al.*, 1992; Miralles *et al.*, 1998b; Cras-Meneur *et al.*, 2001; Duvillie *et al.*, 2003; Duvillie *et al.*, 2006).

Il est possible de mettre en culture en matrice de collagène, des explants pancréatiques prélevés sur des embryons de rat à des stades précédents la différenciation endocrine (E13). Au bout de sept jours de culture, la différenciation de l'ensemble des lignages pancréatiques endocrine et exocrine est observée.

Si l'on met en culture en matrice de collagène des pancréas de rat (E13) en présence de leur mésenchyme, le tissu acinaire se développe massivement par rapport à la masse endocrine, sous l'effet de signaux mésenchymateux.

En revanche en absence de mésenchyme, l'ébauche enrichie en progéniteurs épithéliaux prolifère de façon importante en 24 heures (Myriam Attali données personnelles) puis se différencie en tissu endocrine majoritairement composé de cellules β . Morphologiquement, la différenciation endocrine massive est observée en périphérie de l'explant (bourgeonnement

formant des "oreilles" sept jours après la culture, 40 à 46% des cellules sont insuline positives). Le tissu exocrine se développe au centre du bourgeon (CPA⁺ voir ci-dessous).



1.3 Récapitulatif des caractéristiques principales du matériel biologique utilisé en vue de sélectionner le meilleur vecteur de transfert de gène.

Initialement nous avons utilisé du tissu embryonnaire de rat à E16 pour ces caractéristiques histologiques proches de celles du tissu humain auxquels nous avons accès.

Dans le but de démontrer la capacité de cibler des cellules progéniteurs, nous avons utilisé des ébauches pancréatiques à E13. En effet à ce stade du développement, le bourgeon pancréatique est d'une part riche en progéniteurs immatures et d'autre part les cellules épithéliales ne sont pas encore différenciées.

Les caractéristiques principales de ces ébauches murines sont listées dans le **Tableau 12** et comparées à celles des pancréas embryonnaires humains. C'est en se basant sur ces critères que nous avons sélectionné et évalué les approches de transfert de gène.

2 Sélection du mode de transfert de gène

Il était dans un premier temps essentiel de définir le vecteur adéquat à utiliser pour un transfert de gène optimal sur le type de tissu que nous venons de décrire.

	Pancréas embryonnaires			Pancréas Adulte
	E13 rat	E16 rat	8SG ⁸⁸ humains	
				
Développement du tissu	Immature	Initiation Différenciation précoce		Différencié
Taille tissus	Ø250 µm 0,01 mm ³	250 µm x 750 µm 0,03 mm ³	5mm x 2mm Quelques mm ³	
Mésenchyme/ Conjonctif	Couronne de cellule	Invasif dans les ramifications de l'épithélium		Lobules
Prolifération	Importante	Importante Dépendante du type cellulaire		Moindre
<u>Différenciation Endocrine</u> Glu ⁺ ° / Ins ⁺ °°	Rares / Non	Oui / Rares	Oui / Rares	Oui / Oui
	Progéniteurs endocrines détectés	Souvent co-marquées Ins ⁺ °° + Glu ⁺ °		Ilot de Langerhans
<u>Différenciation Exocrine</u> CPA ⁺ °°°	Rares	Quelques cellules CPA ⁺ dispersées	Quelques cellules Lipase ⁺ dispersées	Acini

° Glu⁺= Détection immuno-fluorescente des cellules exprimant du glucagon
 °° Ins⁺= Détection immuno-fluorescente des cellules exprimant de l'insuline
 °°° CPA⁺= Détection immuno-fluorescente des cellules exprimant la caboxypeptidase A ou CPA
 ⌘ SG: semaine de gestation: stade de développement embryonnaire évalué sur l'âge de l'embryon/foetus.

Tableau 12 Caractéristiques principales des tissus embryonnaires utilisés dans les modèles xénogreffes et organotypiques

Jusqu'à présent, la plupart des études menées étaient focalisées sur des tentatives de transfert de gènes ciblant essentiellement les cellules bêta matures. Dans ce cadre, l'utilisation des vecteurs rétroviraux (vecteurs viraux dérivés des rétrovirus Moloney) n'est pas indiquée. Ils sont certes capables d'intégrer des gènes au sein du génome des cellules hôtes. Cependant, cette intégration est dépendante de la prolifération cellulaire. Ces virus se révèlent inaptes à transférer des gènes dans le noyau de cellules quiescentes, en raison de la barrière formée par l'enveloppe nucléaire entre deux divisions cellulaires. Dans le cas des cellules β dont l'indice de prolifération est faible ce type de vecteur est inadapté. De plus, les essais de thérapie cellulaire via ce mode de transfert de gène n'ont pas été poursuivis car associés à des effets secondaires délétères d'ordre immunologique. D'autres types de vecteurs ont été testés avec de meilleures efficacités comme les AAV (adéno-associated virus).

Le transfert de gène par vecteur viral est une approche utilisée depuis longtemps au laboratoire pour transduire des cellules souches nerveuses humaines ou murines en vue d'applications thérapeutiques substitutives ou neuroprotectrices pour de nombreuses pathologie neuro-dégénératives candidates (Sabate *et al.*, 1995a; Sabate *et al.*, 1995b; Sanchez-Capelo *et al.*, 1999; Sarkis *et al.*, 2000; Buchet *et al.*, 2002a; Buchet *et al.*, 2002b). Nous avons voulu extrapoler cette expertise pour cibler un type cellulaire particulier : les cellules endocrines du pancréas.

2.1 Choix des vecteurs lentiviraux

Au vu des différents essais de transfert de gène dans le pancréas, décrits dans la littérature, il s'avère que l'utilisation de vecteurs viraux semble la méthodologie la plus prometteuse. De plus, notre laboratoire possède une très bonne expertise dans la réalisation d'expériences de transduction virale efficace et spécifique de nombreux types de cultures primaires à l'aide de lentivirus recombinants (Zennou *et al.*, 2001; Buchet *et al.*, 2002a; Vogel *et al.*, 2004; Bemelmans *et al.*, 2005; Bemelmans *et al.*, 2006).

Les lentivirus font partie de la superfamille des *Retroviridae* (virus à ARN), le plus connu étant le VIH (Virus de l'immunodéficience humaine). Ils possèdent une structure génomique comparable à celle des rétrovirus oncogènes à l'exception de séquences complémentaires codant pour des protéines accessoires. Comme les rétrovirus classiques et contrairement aux adénovirus, lors du cycle d'infection, l'ARN viral du lentivirus est rétro-transcrit en ADN et intégré dans le génome de la cellule hôte ce qui garantit la stabilité d'expression des gènes

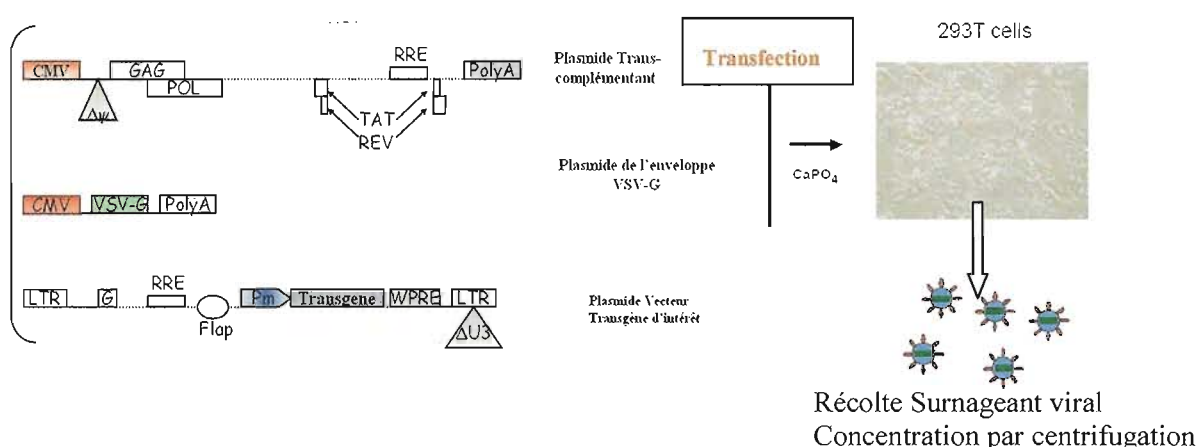
viraux. Cependant parmi les protéines accessoires des lentivirus, l'une d'entre-elles, Vpr, élément de la particule virale, participe au mécanisme actif d'import nucléaire du complexe de pré-intégration (protéines accessoires et génome proviral) en synergie avec une autre protéine de la matrice (Ma) ainsi qu'une région cPPT-CTS ou flap centrale (Zennou et al, 2000). L'ensemble de ces fonctions accessoires, permet l'intégration efficace et stable du transgène dans le génome de la cellule hôte.

Contrairement au rétrovirus, l'intérêt des vecteurs dérivés du VIH vient de leur capacité de transduire des cellules indépendamment de leur état mitotique (quiescentes ou non).

La possibilité de changer l'enveloppe des particules virales permet de modifier le tropisme des particules infectieuses (Sarkis, 2001). Nous avons opté pour la modification de l'enveloppe native du VIH permettant l'expression de la glycoprotéine de surface VSV-G (vesicular stomatitis virus glycoprotein G), ce qui donne au lentivirus modifié des propriétés pan-tropiques. De plus cette enveloppe étant très stable, elle confère aux particules une résistance permettant la concentration des stocks viraux. Ce dernier point facilite grandement la production de tels vecteurs viraux et permet une concentration d'un facteur 500 à 2000 par ultracentrifugation.

Ces vecteurs de dernière génération réunissent toutes les caractéristiques bio-sécuritaires optimales: **(i)** de nombreuses délétions du génome viral ont été effectuées afin d'abolir les fonctions répliquatives virales et la pathogénicité de certaines protéines virales elles-mêmes; **(ii)** le promoteur interne aux LTR (U3) a été délété (Δ U3) empêchant l'activation des gènes proches du site d'intégration; **(iii)** un fractionnement des constructions en trois plasmides trans-complémentants permet de réduire les probabilités de recombinaison.

Le principe de production, résumé ci-dessous, est basé sur la co-transfection transitoire de trois plasmides dans des cellules 293T dérivées de cellules HEK (human embryonic kidney) exprimant de façon stable l'antigène large T de SV40. 48h après la transfection (au phosphate de calcium), le surnageant infectieux est récolté, traité à la DNase I, filtré et concentré par ultracentrifugation d'après le protocole établi par (Naldini *et al.*, 1996) et optimisé depuis au laboratoire par le groupe de thérapie génique.



2.2 Obtention de vecteurs viraux spécifiques

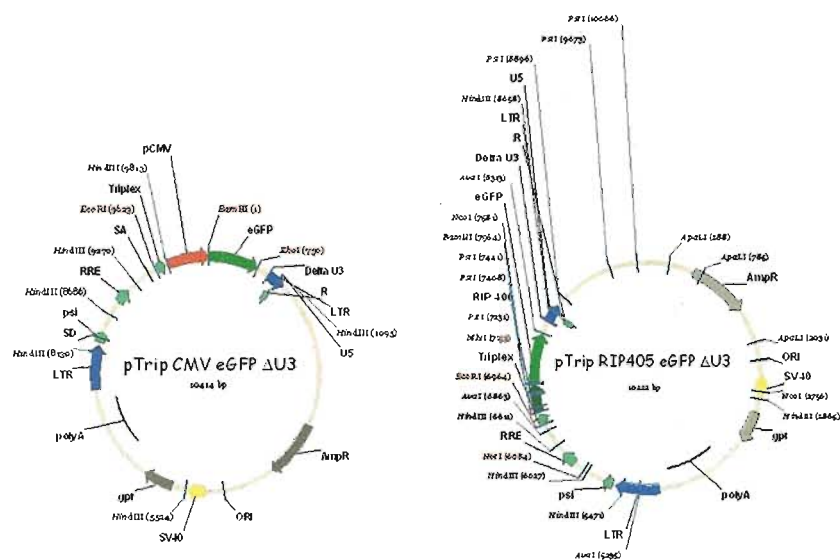
Le transgène peut être sous contrôle de divers promoteurs ou enhancer associés à un promoteur minimal: **(i)** ceux dits ubiquitaires (promoteurs activables dans de multiples types cellulaires différents), tels que le promoteur viral CMV (Cytomégalo virus), les promoteurs eucaryotes PGK (Phosphoglycerate kinase), EF1alpha (Elongation factor 1 alpha) ou encore **(ii)** ceux dits spécifiques (promoteur activé selon la spécificité du type cellulaire ciblé).

Dans notre équipe nous avons exploité la possibilité de remplacer les fragments promoteurs dirigeant l'expression du transgène contenu dans les particules virales, afin de transduire spécifiquement un type cellulaire donné. Des vecteurs contenant des promoteurs dirigeant l'expression de gène spécifiquement dans des sous-types pancréatiques sont disponibles, par exemple des fragments du promoteur de l'insuline de rat, de l'élastase, ou encore de Pdx1 (Pancreatic and Duodenal homeobox 1).

Par ailleurs, nous avons amélioré les premières constructions en remplaçant les transgènes initiaux par des gènes rapporteurs facilement détectables : eGFP (enhancer green fluorescent protein), hrGFP (humanized GFP).

Dans le but de restreindre l’expression du gène rapporteur aux cellules β matures, nous avons construit pour cette étude des vecteurs lentiviraux recombinants permettant l’expression d’un gène rapporteur GFP sous le contrôle de différentes formes du promoteur de l’insuline 2 de rat. Ces nouvelles constructions ont été évaluées par rapport à un vecteur contrôle standard exprimant aussi la protéine eGFP sous le contrôle du promoteur ubiquitaire fort CMV.

Les constructions clonées et utilisées sont représentées sur la figure ci-dessous (carte des plasmides).



Vecteur	pTrip CMV eGFP ΔU3	pTrip Rip405 eGFP ΔU3
promoteur	Cytomégalo­virus 602pb	Insuline de rat 405pb
transgène	eGFP (716pb)	
Domaine d'expression	Ubiquitaire	Restreint aux cellules β
Cinétique d'expression	12 à 16heures	48 heures

Figure 29 Vecteurs lentiviraux "ubiquitaire" (CMV) et "spécifique des cellules β " (Rip405).

2.3 Comment évaluer la spécificité et l'efficacité des vecteurs lentiviraux?

Nous avons été les premiers au laboratoire à emprunter la stratégie de ciblage par l'utilisation de vecteurs spécifiques. Il était donc nécessaire de trouver des systèmes efficaces d'évaluation

de la qualité de la production de vecteurs viraux. En effet, le dosage quantitatif de chaque production est estimé par titration colorimétrique (test ELISA). Ce test permet de doser la quantité de protéine P24 (protéine de la capside virale) présente dans un aliquot de stock viral produit après concentration. Ce dosage permet d'obtenir une indication sur le rendement de production de particules virales sans toutefois nous renseigner sur la qualité des particules produites ou sur l'efficacité de transduction du stock.

Dans le but de standardiser les infections d'épithéliums ultérieures, il était important d'établir ces données qualitatives pour chacune des différentes productions virales obtenues par titration de l'efficacité de transduction (TU pour transducing unit). Pour ce faire, j'ai testé chaque production virale sur la lignée cellulaire β pancréatique min-6 (Insulinome de souris) qui possède la machinerie transcriptionnelle nécessaire à l'activation des séquences promotrices de l'insuline. Le TU est évalué en nombre de cellules transduites ($C\tau$) pour un volume donné de suspension virale ($C\tau/\text{mL}$). Cette valeur peut être obtenue par comptage manuel en dilutions limites ou par cytométrie de flux lorsqu'il s'agit de cellules transduites exprimant la GFP. A l'aide d'un cytomètre FACScan (Becton Dickinson), j'ai donc évalué le pourcentage de cellules eGFP positives transduites (f_{eGFP}).

La valeur TU est alors calculée en appliquant la formule suivante:

$$\textbf{TU} = \textbf{f_{eGFP}C_0V}$$

C_0 étant le nombre de cellules initialement infectées au temps 0,

V le volume de suspension virale utilisée.

Le TU est exprimé en nombre de cellules transduites ($C\tau$) pour un volume donné de suspension virale ($C\tau/\text{mL}$).

Les stocks viraux PTRIP $\Delta\text{U3.RIP405-eGFP}$ et PTRIP $\Delta\text{U3.CMV-eGFP}$, transduisent de façon satisfaisante la lignée min6:

Sur lignée min6	PTRIP $\Delta\text{U3.RIP405-eGFP}$	PTRIP $\Delta\text{U3.CMV-eGFP}$
TU	$8 \times 10^7 \text{ } C\tau/\text{mL}$	$7 \times 10^7 \text{ } C\tau/\text{mL}$

La validation de la spécificité des fragments RIP405 et 700 (promoteur de l'insuline) dans un contexte lentiviral, a montré de façon claire l'absence d'expression de la GFP sur la lignée 293T uniquement pour la construction RIP405. En revanche, une fuite d'expression du

transgène a été observée par cytométrie de flux pour le vecteur PTRIP Δ U3.RIP702-eGFP, ce qui nous a conduits à éliminer cette construction de notre étude.

Les résultats présentés ci-dessus ont été intégrés comme premier résultat de l'article intégré dans ce chapitre (voir § Specificity of the rat insulin promoter in a lentiviral context in vitro).

En conclusion, nous disposons de stocks de vecteurs viraux efficaces, l'un ubiquitaire PTRIP Δ U3.CMV-eGFP et l'autre spécifique PTRIP Δ U3.RIP405-eGFP, capable de transduire un type cellulaire spécifique.

3 Mise en place des conditions expérimentales optimales permettant le transfert de gène dans des explants de pancréas embryonnaire

Les études préliminaires d'utilisation de vecteurs lentiviraux spécifiques sur ébauches pancréatiques ont été peu concluantes, laissant supposer que les cellules cibles ne sont pas accessibles aux particules virales. Le **Tableau 13** résume les différentes expériences effectuées. Nous avons alors utilisé le modèle de culture organotypique ainsi que des artifices techniques (résumés dans le même tableau) pour y pallier et favoriser l'accès des particules virales aux cellules progéniteurs endocrines.

3.1 Bilan : influence des différents traitements sur le développement du greffon

- ❖ La greffe d'ébauches pancréatiques natives non traitées permet un meilleur développement de la masse pancréatique globale.
- ❖ La "fragmentation" (mécaniques) des ébauches en morceaux ne semble pas défavoriser le développement de la masse pancréatique globale.
- ❖ La dissociation enzymatique par la dispase altère le développement du tissu. Un traitement modéré est donc nécessaire à la survie du tissu en greffe.
- ❖ La greffe de tissus enrichie en progéniteur endocrine n'est qu'un essai préliminaire mais il semble que le tissu greffé ne soit plus capable de proliférer. En revanche, tout comme dans les cultures organotypiques, l'absence de mésenchyme n'altère pas la capacité de différenciation du tissu puisque nous avons observé des cellules exprimant les marqueurs insuline et glucagon quelques semaines après la greffe.

		Stade E ^y	Culture organotypique		Xénogreffe	
			τ	Proliféra°/différencia° endocrine/acinaire	τ	Proliféra°/différencia° endocrine/acinaire
Natif						
$\emptyset$	E16				$\hookrightarrow 0 \varnothing$ épithéliales	Très bon
	E16				Injection* $\hookrightarrow 0 \varnothing$ épithéliales	Très bon
	E13	$\hookrightarrow 0 \varnothing$ épithéliales $\hookrightarrow$ Périphérie Mes °		endo Faible / différencié exo Forte / différencié	$\hookrightarrow 0 \varnothing$ épithéliales	Très bon
Mécanique						
ébauches en morceaux	E16				$\hookrightarrow 0 \varnothing$ épithéliales	Très bon
	E13				$\hookrightarrow 0 \varnothing$ épithéliales	Très bon
Dispase I [c] = 0.16mg/ mL						
Dissocié						
⌚ 20'	E16				$\hookrightarrow$ Qques $\varnothing$ épithéliales	Bon
⌚ 20'	E13				Pas de développement	
⌚ 05'	E13				$\hookrightarrow$ Qques $\varnothing$ épithéliales	Bon
Collagénase A [c] = 0.5mg/mL						
Déplété						
⌚ 12'	E13	Très bonne $\approx$ 50% du total $\approx$ 70% des $\varnothing$ ins+		endo Forte / différencié <i>Ins⁺ majoritaire (46%)</i> exo Faible / différencié <i>(CPA⁺)</i>	$\hookrightarrow$ Oui	Différenciation uniquement

Abréviations:

τ = Transduction; $\varnothing$ = Cellules; $\emptyset$ = Aucun traitement ébauches constituées de l'épithélium intègre entouré de son mésenchyme; **endo** = endocrine; **exo** = exocrine; **Mes** = Mésenchyme

Tableau 13 Récapitulation des expériences d'infection d'ébauches pancréatiques de rat

Ce tableau résume les différents essais que nous avons effectués pour obtenir un taux de transduction optimal des cellules épithéliales pancréatiques dans le but de cibler les futures cellules endocrines du pancréas.

° Nous avons utilisé un vecteur lentiviral ubiquitaire PTRIP ΔU3.CMV-eGFP. Pour comprendre les raisons de l'absence de cellules endocrines transduites lorsque l'on infecte un épithélium entouré de son mésenchyme. Dans ce cas, seules les cellules périphériques sont transduites.

* Après anesthésie d'une souris scid greffée depuis quelques semaines, nous avons injecté 0,2μL de suspension virale PTRIP ΔU3.CMV-eGFP à l'aide d'une pompe à injection; et cela à trois endroits différents du greffon déjà développé. Après une semaine d'incubation, nous avons recherché la présence de cellules transduites. Il s'avère que seules les cellules situées dans la périphérie proche de la zone d'injection sont transduites. Là encore, la compaction du tissu constitue une barrière à la diffusion des particules virales.

3.2 Bilan : efficacité d'infection/transduction

- ❖ Les lentivirus utilisés sont bien pan-tropiques puisque l'utilisation d'un vecteur ubiquitaire PTRIP ΔU3.CMV-eGFP permet une transduction de tous les types cellulaires.
- ❖ Les lentivirus PTRIP ΔU3.RIP405-eGFP utilisés sont spécifiques : la transduction est restreinte uniquement aux cellules β. Aucun autre type cellulaire endocrine, exocrine ou canalaire n'a été transduit.
- ❖ Les lentivirus utilisés sont bien intégratifs dans nos modèles. L'expression du transgène est stable dans le temps, puisqu'on observe des cellules β exprimant la GFP après un mois de greffe.
- ❖ L'efficacité de transduction est proportionnelle à l'accessibilité des particules virales aux cellules épithéliales.

En conclusion, l'infection d'ébauches pancréatiques non traitées préalablement ne permet pas de cibler les précurseurs endocrines situés au centre du tissu. Un compromis est de dissocier modérément le tissu pour permettre la diffusion des particules virales dans le tissu sans défavoriser son développement.

Ainsi, après optimisation des conditions d'infection, ces virus ont donc été utilisés pour infecter des explants de pancréas d'embryons de rat (E16), partiellement dissociés, à un stade précédant toute différenciation endocrine. Cependant, il existe à ce stade quelques cellules β, ce qui ne nous permet pas d'exclure le fait que nous ayons infecté des cellules déjà différenciées et non pas des cellules progénitrices.

4 Capacité d'infection de cellules progéniteurs/souches

La **Figure 30** résume les étapes de transfert de gène sur tissus épithéliaux pancréatiques embryonnaires.

Avant d'appliquer ces méthodes à du tissu embryonnaire humain, il était important de vérifier que les cellules infectées étaient bien des progéniteurs.

Dans le système de culture organotypique, nous avons utilisé des épithéliums très précoces (E13) totalement dépourvus de cellules β matures. Ainsi toutes les cellules transduites (eGFP⁺) sont nécessairement issues de cellules immatures infectées à un stade non différencié.

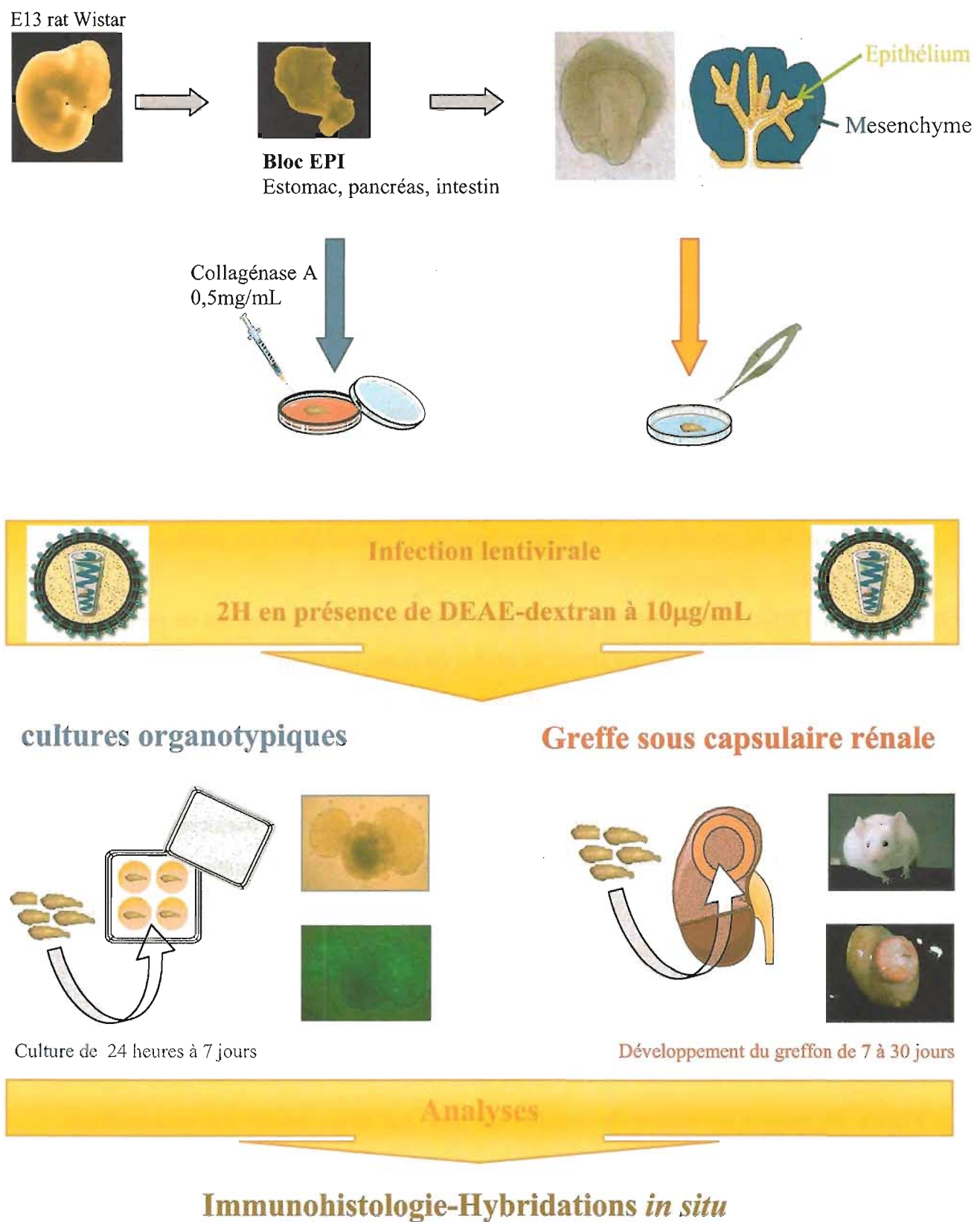


Figure 30 Transfert de gène sur modèles de développement pancréatique in vitro & in vivo

Ce schéma récapitule les étapes préliminaires d'obtention des épithéliums pancréatiques de rat au stade E13 en présence ou en absence de mésenchyme. Puis celle du transfert de gène et leur analyse.

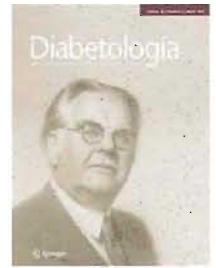
Afin de démontrer l'infection de cellules progéniteurs/souches, nous avons effectué un co-marquage de l'expression du transgène rapporteur eGFP avec des marqueurs précoces du développement pancréatique par immunofluorescence et par hybridation *in situ*. Nous nous sommes placés dans le cas de figure où la transduction est la plus efficace (culture organotypique d'épithéliums infectés par PTRIP ΔU3.CMV-eGFP). Il suffit alors d'observer les types cellulaires exprimant le transgène à un stade où aucune différenciation n'est encore détectable. Pour cela nous avons le choix entre deux marqueurs des progéniteurs endocrines du pancréas PDX1 ou NGN3. L'expression de PDX1 se déroule en deux phases, l'une précoce définissant les cellules souches pancréatiques très immatures, l'autre dite tardive définissant les cellules β matures. Définir les cellules progénitrices/souches endocrines revient donc à détecter les cellules exclusivement positives pour *pdx1* et de surcroît n'exprimant pas encore l'insuline. Nous ne possédons pas d'anticorps compatibles permettant d'effectuer le triple marquage des cellules transduites (eGFP) et progénitrices (*pdx1*⁺/*ins*⁻).

Nous nous sommes donc intéressés au second marqueur connu : NGN3. Le maximum d'expression de l'ARNm de *Ngn3* se situe après 24-48 heures de culture (Duvillie *et al.*, 2006). L'étude cinétique de l'expression de ce facteur de transcription est transitoire. En effet il disparaît 24 heures après son expression maximale. Malgré l'instabilité d'expression de *Ngn3*, il reste néanmoins le meilleur marqueur de cellules progéniteurs endocrines. En effet les cellules exprimant ce facteur de transcription sont assurément des cellules progénitrices/souches endocrines. Nous avons donc opté pour la détection des cellules *ngn3*⁺ transduites (hybridation *in situ* et immunofluorescence).

Il ressort de ces données que nous possédons un système permettant de transduire de façon efficace des cellules précurseurs immatures pancréatiques. De plus, par l'utilisation de séquences promotrices de l'insuline de rat nous avons restreint l'expression du gène rapporteur spécifiquement aux cellules β.

ARTICLE DIABETOLOGIA (2005) 48 : PAGES 709–719

DOI 10.1007/s00125-005-1694-6
(11 pages)



Efficient restricted gene expression in beta cells by lentivirus-mediated gene transfer into pancreatic stem/progenitor cells

M. Castaing^{1*} et A. Guerci^{2*} . J. Mallet² . P. Czernichow³ . P. Ravassard² . R. Scharfmann¹ 

¹ M. Castaing . R. Scharfmann
INSERM EMI 0363, Faculté Necker, 156 rue Vaugirard, 75015 Paris, France
Tel.: +33-1-40615565; Fax: +33-1-43060443

² A. Guerci . J. Mallet . P. Ravassard
CNRS UMR 7091, Hôpital Pitié Salpêtrière, 83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France

³ P. Czernichow
INSERM U457, Hôpital Robert Debré, 48 Bd Serurier, 75935 Paris cedex 19, France
Paris, France

* The first two authors contributed equally to this work.

 e-mail: scharfmann@necker.fr

Acknowledgements

This work was supported by the Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF Center for Beta Cell Therapy in Europe), INSERM/Fondation pour la Recherche Médicale/Juvenile Diabetes Research Foundation (4DA03H), the Association Française des Diabétiques (AFD), the Fondation pour la Recherche Médicale, INSERM, the region Ile de France, Retina France and the University Paris VI.

The authors are deeply grateful to Yasmine Hazhouz, Emilie Neveu, Isabelle LeNin and Stephanie Bauchet for technical assistance and to Medeva Ghee and Chamsy Sarkis for helpful comments and critical reading of the manuscript.

Muriel Castaing was successively supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and by l'Association d'Aide aux Jeunes Diabétiques (AJD).

Aline Guerci was successively supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie and by the FRM.



M. Castaing · A. Guerci · J. Mallet · P. Czernichow ·
P. Ravassard · R. Scharfmann

Efficient restricted gene expression in beta cells by lentivirus-mediated gene transfer into pancreatic stem/progenitor cells

Received: 20 September 2004 / Accepted: 4 December 2004 / Published online: 10 March 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract *Aims/hypothesis:* Gene transfer into pancreatic beta cells, which produce and secrete insulin, is a promising strategy to protect such cells against autoimmune destruction and also to generate beta cells in mass, thereby providing a novel therapeutic approach to treat diabetic patients. Until recently, exogenous DNA has been directly transferred into mature beta cells with various levels of success. We investigated whether exogenous DNA could be stably transferred into pancreatic stem/progenitor cells, which would subsequently differentiate into mature beta cells expressing the transgene. *Methods:* We designed transplantation and tissue culture procedures to obtain ex vivo models of pancreatic development. We next constructed recombinant lentiviruses expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of either the rat insulin promoter or a ubiquitous promoter, and performed viral infection of rat embryonic pancreatic tissue. *Results:* Embryonic pancreas infected with recombinant lentiviruses resulted in endocrine cell differentiation and restricted cell type expression of the transgene according to the specificity of the promoter used in the viral construct. We next demonstrated that the efficiency of infection could be further improved upon infection of embryonic pancreatic epithelia, followed by their in vitro culture, using conditions that favour endocrine cell differentiation. Under these conditions, endocrine stem/progenitor cells expressing neurogenin 3 are efficiently transduced by recombinant lentiviral vectors.

Moreover, when eGFP was placed under the control of the insulin promoter, 70.4% of the developed beta cells were eGFP-expressing cells. All of the eGFP-positive cells were insulin-producing cells. *Conclusions/interpretation:* We have demonstrated that mature rat pancreatic beta cells can be stably modified by infecting pancreatic stem/progenitor cells that undergo endocrine differentiation.

Keywords Beta cells · Gene transfer · *ngn3* · Recombinant lentivirus · Stem/progenitor cells

Abbreviations CMV: cytomegalovirus · CPA: carboxypeptidase A · E: embryonic day · eGFP: enhanced green fluorescent protein · HBSS: HEPES buffered saline solution · ISH: in situ hybridisation · *ngn3*: neurogenin 3 · RIP: rat insulin II gene promoter · *scid*: severe combined immunodeficiency · TU: transduction unit · VSV: vesicular stomatitis virus

Introduction

Type 1 diabetes mellitus is due to an autoimmune process resulting in the destruction of pancreatic beta cells, the cells that produce and secrete insulin. Replacement of insulin-producing tissue by transplantation of mature beta cells represents an effective method of curing type 1 diabetes. However, many obstacles remain before cell replacement therapy [1] can be used routinely to treat diabetic patients [2]. The major issues to be solved are allorejection, recurrence of anti-islet cell autoimmunity and the shortage of available donor tissue.

To address the immunological problems and increase the limited supply of human tissue available for grafts, attempts have been made to transfer exogenous DNA into mature beta cells. Several gene delivery viral systems, such as moloney-based retroviral vectors, adenoviral vectors, adeno-associated viral vectors, or lentiviral vectors have been employed for ex vivo gene transfer into pancreatic islet cells. Moloney-based retroviral vectors were inefficient in transducing mature insulin-expressing cells due to the lack

M. Castaing · R. Scharfmann (✉)
INSERM EMI 0363, Faculté Necker,
156 rue Vaugirard,
75015 Paris, France
e-mail: scharfmann@necker.fr
Tel.: +33-1-40615565
Fax: +33-1-43060443

A. Guerci · J. Mallet · P. Ravassard
CNRS UMR 7091, Hôpital Pitié Salpêtrière,
Paris, France

P. Czernichow
INSERM U457, Hôpital Robert Debré,
Paris, France

of proliferation of mature beta cells [3]. Adenoviruses were highly efficient in transducing non-dividing beta cells [3–5], however, the expression of the transgene was transient. This could be due either to the absence of genome integration of the virus or to the elimination of transduced cells by the host immune system [6]. To circumvent this limitation in long-term expression, adeno-associated viral vectors have been used to transduce pancreatic islet cells [7, 8]. Lentiviral vectors were capable of transducing mature islet cells with sustained expression of either reporter genes [3, 9, 10], therapeutic molecules [10], or immortalising genes [11]. Together, the above data indicate that exogenous DNA can be stably transferred to mature beta cells [3, 9, 10], providing limited protection against immune destruction [10]. However, this approach failed to generate beta cell lines [11].

In the aforementioned studies, only mature beta cells were infected and transduced with various viral vectors. In cell types of the haematopoietic system, mature cells have been modified by viral infection of progenitor cells that undergo differentiation. Several groups have recently reported successful transduction of reporter genes or genes of therapeutical importance into progenitor cells that were taken from umbilical cord blood or bone marrow and differentiated into mature cells [12–15]. In these experiments, the transgene was constitutively expressed, irrespective of the differentiation stage. More recently, Pawliuk and co-workers further modified the system using cell-type-specific promoters [16]. They infected haematopoietic stem cells with recombinant lentiviruses expressing their gene of interest under the control of the beta globin locus control region, achieving high erythroid-specific gene expression levels [16].

While the results described above concern the haematopoietic system, only a limited number of studies in solid tissue show stable modification of mature cells by transduction of progenitor cells [17–19]. However, in these reports, only constitutive promoters were used, resulting in an expression of the transgene without cell type restriction.

Our objective was to determine whether beta cells can be modified by infecting stem/progenitor cells that will differentiate into beta cells. For this purpose, we designed *ex vivo* experimental models in which immature embryonic pancreases, rich in endocrine progenitors, develop into mature pancreatic tissue. We next analysed conditions to infect immature pancreatic tissues with recombinant lentiviruses expressing enhanced green fluorescent protein (eGFP) under the control of the insulin promoter. Our data demonstrate that recombinant lentiviruses can infect pancreatic stem/progenitors, such as cells positive for neurogenin 3 (*ngn3*) that will differentiate into beta cells expressing the transgene of interest. This strategy represents a new approach to the generation of genetically modified beta cells.

Materials and methods

DNA constructs and recombinant lentiviral production
The backbone of the lentiviral construct, pTRIP, has been

previously described [20]. The vector, pTRIP Δ U3.CMV-eGFP [17], expresses the *eGFP* gene under the control of an internal cytomegalovirus (CMV) promoter. A new lentiviral vector, pTRIP Δ U3.RIP405-eGFP, was constructed with the Rat insulin II gene promoter (RIP) in order to restrict the expression of *eGFP* to insulin-producing cells. A 405-bp fragment of RIP was amplified from the PBS-RIP-beta globin plasmid (kindly provided by P. Herrera, University of Geneva, Switzerland) [21] using the PCR expand system (Roche Diagnostic, Meylan, France) with the following primers: *Mlu*I RIP405 sense 5'cgacgcgtGGACACAGCTATCAGTGGGA3' and *Bam*HI RIP antisense 5'cgggatccTAGGGCTGGGGGTTACT3'.

The resulting PCR product was subcloned into the pGEMT-easy vector (Promega, Charbonnières, France) and the inserted RIP405 fragment was entirely sequenced. The *Mlu*I–*Bam*HI digestion fragment was then inserted into a *Mlu*I–*Bam*HI linearised promoterless pTRIP Δ U3-eGFP vector (kindly provided by Dr A. P. Bemelmans, CNRS UMR 7091, Paris).

Lentiviral vector stocks were produced by transient transfection of 293T cells with the p8.7 encapsidation plasmid (Δ Vpr Δ Vif Δ Vpu Δ Nef) [22], pHCMV-G, encoding the vesicular stomatitis virus (VSV) glycoprotein-G [23] and the pTRIP Δ U3. recombinant vector as previously described [20]. The supernatants were treated with DNase I (Roche Diagnostic) prior to ultracentrifugation and the resulting pellet was resuspended in PBS, aliquotted and frozen at -80°C until use. The amount of p24 capsid protein was quantified by the HIV-1 p24 ELISA antigen assay (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Promoter specificity in a lentiviral context: titrations and transduction efficiency
The titration of each vector stock was determined by infecting Min6 and 293T cells. Min6 cells, derived from a mouse insulinoma [24], and 293T cells, derived from human kidney, were grown at 37°C in DMEM (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 15% and 10% heat-inactivated fetal calf serum, respectively. Cells were plated in 24-well plates and kept in contact with increasing amounts of each lentiviral suspension for 1 h with diethylaminoethyl-dextran 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) [25]. The virus-containing medium was then removed and fresh medium was added. After a 72-h incubation period, cells were washed with PBS, detached with trypsin and fixed in 1% formaldehyde–PBS. The number of GFP-positive cells was analysed using a flow cytometer (FACScan; Becton Dickinson, Le-Pont-de-Claix, France). Acquisition data were processed with CellQuest for Macintosh. Transduction units (TU) were calculated using the formula:

$$\text{TU} = f_{\text{eGFP}} C_0 V$$

where f_{eGFP} is the frequency of eGFP-positive cells determined by FACScan, C_0 is the total number of target cells infected and V is the volume of the viral stock used.

The eGFP titres were analysed for several virus dilutions. Each point was performed in triplicate. The mean titre values were calculated for the viral dilutions corresponding to 1–20% of transduced cells in order to avoid multiple infection events.

Preparation of pancreatic rudiments Pregnant Wistar rats were obtained from Janvier (CERJ, Le Genest, France). All animal manipulations were performed according to the guidelines of the French Animal Care Committee. The morning post coitum was designated as embryonic day (E) 0.5. At E13.5 and E16.5 days of gestation, pregnant female rats were killed by CO₂ asphyxiation. Rat embryos were removed from the uterus, the digestive tracts isolated and the pancreatic primordia dissected [26]. Intact or partially dissociated embryonic pancreases were prepared for transplantation. The pancreatic buds were incubated with 0.16 mg/ml of Dispase I (Roche Diagnostic) for 20 min and subsequently mechanically dissociated. The purified pancreatic epithelium used for organotypical culture was separated from its surrounding mesenchyme by enzymatic and mechanical treatments as previously described [27, 28].

Infection of embryonic pancreases and transplantation Recombinant lentiviruses were used to infect either intact or partially dissociated pancreases. Tissues were incubated with viral particles (120 ng of p24) for 2 h at 37°C with 5% CO₂ atmosphere, in 200 µl of RPMI-1640 medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum containing HEPES (10 mmol/l), L-glutamine (2 mmol/l), non-essential amino acid (Invitrogen), penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml). To increase the viral infection efficiency, diethylaminoethyl-dextran was added to a final concentration of 10 µg/ml. After lentiviral infection, tissues were washed twice with HEPES buffered saline solution (HBSS, Invitrogen) and kept on ice until transplantation into severe combined immunodeficient (*scid*) mice.

Seven-week-old, male *scid* mice (Charles River Laboratories, L'arbresle, France) were maintained in isolators.

Using a dissecting microscope, the pancreases were implanted under the kidney capsule as previously described [29], with the following modifications. The left kidney was exteriorised; a small transverse incision was made through the capsule on the ventral surface of the kidney, near the inferior pole. A small silicon cylinder was pushed under the capsule to provide a sealed space to confine the transplanted cells and tissues [30]. The tissues were then introduced into the cylinder using forceps and/or a Hamilton syringe. At different time points after transplantation, the mice were killed, the kidney removed, and the graft dissected. Fixation with 3.7% formaldehyde was used prior to embedding in paraffin for immunohistological analysis. Consecutive 4-µm-thick sections were collected on gelatinised glass slides and immunofluorescent analysis was performed as described elsewhere [27, 31].

Infection of embryonic pancreases and organotypical culture Embryonic pancreatic epithelia were infected as described above for whole pancreases. After a 2-h infection period, they were washed twice with HBSS and grown in three-dimensional collagen gels as described previously [27, 28]. Cultures were maintained for 1, 3 or 7 days. The rudiments were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde (Carlo-Erba Reactifs, Val de Reuil, France), cryo-protected in 15% sucrose–PBS at 4°C overnight, embedded in 15% sucrose–7% gelatin PBS and frozen at –50°C in isopentane (Carlo-Erba Reactifs). We collected 10-µm-thick cryosections and analysed them by immunohistochemistry or in situ hybridisation.

Immunohistochemical procedures Immunofluorescent staining was performed according to the manufacturer's instructions. Primary antisera, applied on paraffin sections, include mouse monoclonal anti-insulin or anti-glucagon (1/2,000; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), anti-eGFP (1/400; BD Biosciences Clontech-Ozyme, Saint Quentin Yveline, France) and rabbit polyclonal anti-insulin or anti-glucagon (1/2,000; DiaSorin, Anthony, France), anti-pan-cytokeratin (1/500; Dako, Trappes, France), and anti-carboxypeptidase A (1/600; Biogenesis/Valbiotech AbCys, Paris, France), antibodies. The fluorescent secondary antibodies obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Beckman Coulter) were fluorescein anti-mouse antibodies (1/150), fluorescein anti-rabbit antibodies (1/200) and Texas-red anti-mouse or rabbit antibodies (1/400). Photographs of the sections were taken using a fluorescence microscope (Leica, Leitz DMRB, Rueil-Malmaison, France) and digitised using a Hamamatsu (Middlesex, NJ, USA) C5810 cooled 3CCD camera.

For immunofluorescence detection on cryosections, primary antibodies used were mouse monoclonal anti-eGFP (1/400; Abcam, Cambridge, UK) and rabbit polyclonal anti-insulin (1/2,000; DiaSorin). The species-specific affinity-purified secondary antibodies included FITC-conjugated goat anti-mouse (1/150; Caltag Tebu, Burlingame, CA, USA) and CY3-conjugated goat anti-rabbit IgG (1/400; Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Single-labelled sections incubated with mismatched secondary antibodies showed no immunostaining, confirming the specificity of the secondary antisera. Photographs of the sections were taken on a Leica, Leitz TCS confocal microscope with a krypton–argon laser beam.

Quantitative analysis Tissue sections were stained with bis benzimide Hoechst 33258 trihydrochloride (Sigma-Aldrich). The quantitative analysis of the number of GFP-positive and/or insulin-expressing cells per epithelium after culture was performed by counting the number of immunoreactive cells for which a nucleus was clearly detected.

Cold in situ hybridisation Cold in situ hybridisation (ISH) was performed as described previously [32, 33]. Antisense riboprobes were generated from cDNA or PCR fragments

subcloned into the pGEMTeasy vector (Promega). The entire coding region of the eGFP fragment (711 bp) was amplified from the pTRIP ΔU3.-eGFP plasmid with the following primers: 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' and 5'-TACTTGTACAGCTCGTCC-3'. Both antisense and sense ngn3 riboprobes (726 bp) were prepared as previously described [32]. Plasmids were linearised and used as templates for the synthesis of sense or antisense riboprobes by T7 or SP6 RNA polymerase (Promega), in the presence of digoxigenin-UTP (Roche Diagnostic). For double in situ hybridisation, either digoxigenin-UTP (for ngn3) or fluorescein-UTP (for eGFP) was used. Colorimetric revelations were performed with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and either nitroblue tetrazolium (Promega) for digoxigenin-UTP, or 2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyl-tetrazolium chloride (Roche Diagnostic) for fluorescein-UTP, to obtain the blue or red staining, respectively.

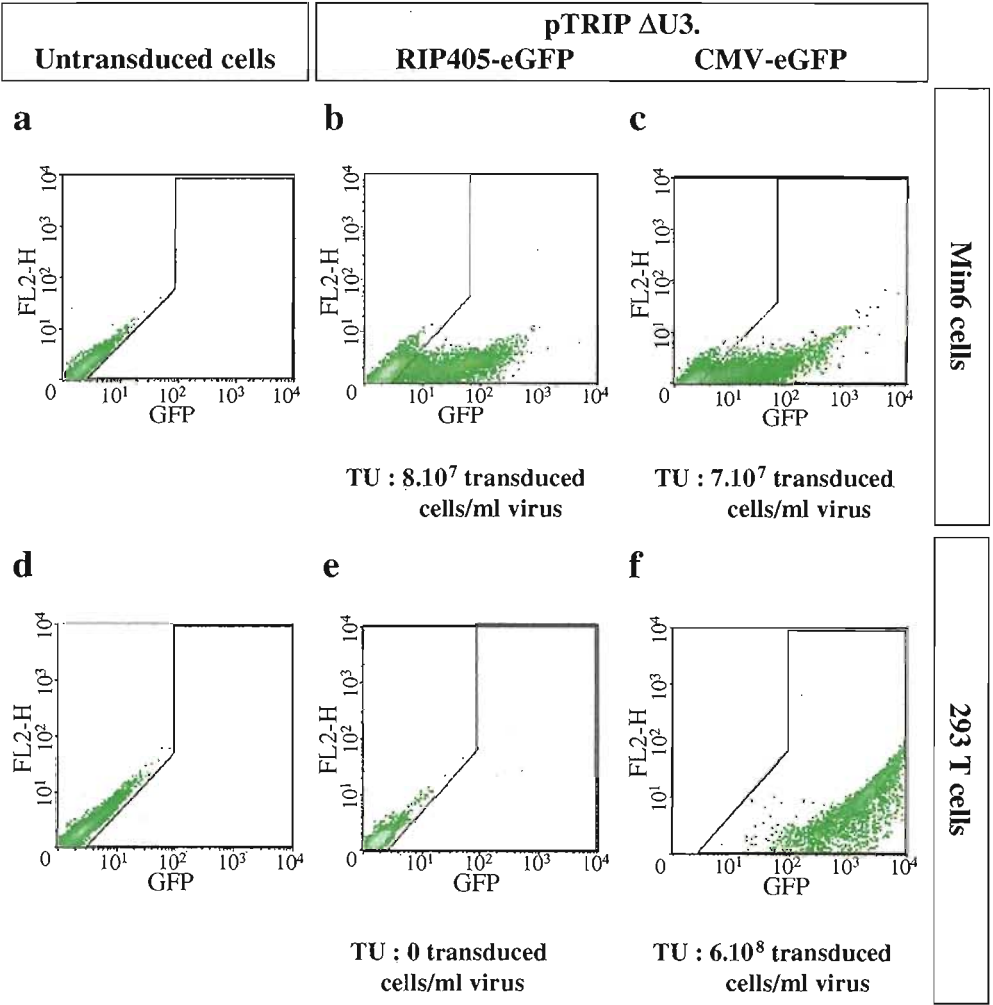
Cold in situ hybridisation and immunofluorescence double labelling ISH was performed with an ngn3 digoxigenin-labelled antisense riboprobe and revealed in blue as described above. After several washes in PBS, eGFP immunofluorescence labelling was achieved according to the manufacturer's instructions with a rabbit polyclonal anti-eGFP antibody

(1/400; BD Biosciences Clontech-Ozyme) and a fluorescein anti-rabbit secondary antibody (1/200; Jackson Immuno-research Laboratories).

Results

Specificity of the rat insulin promoter in a lentiviral context in vitro In order to stably modify mature insulin-producing cells after gene transfer into pancreatic progenitors, we first constructed a lentiviral vector designed to restrict the transgene expression in beta cells. We produced recombinant lentiviral vectors (pTRIP ΔU3), pseudotyped with the VSV G-glycoprotein, that expressed the eGFP reporter gene under the control of either a 405-bp fragment of the rat insulin promoter (RIP405) or the ubiquitous CMV. To evaluate whether eGFP expression driven by the RIP405 promoter was restricted to mature beta cells in vitro, we infected Min6 cells, derived from a mouse insulinoma, and 293T cells, derived from human kidney, with either pTRIP ΔU3.RIP405-eGFP or pTRIP ΔU3.CMV-eGFP viruses. Flow cytometry analysis detected eGFP-positive cells in Min6 cells infected with pTRIP ΔU3.RIP405-eGFP (Fig. 1b), but not in 293T cells infected with the same

Fig. 1 Flow cytometry analysis of Min6 (a, b, c) and 293T (d, e, f) cells that were either untransduced (a, d) or transduced by pTRIP ΔU3.Rip405-eGFP (b, e) HC and pTRIP ΔU3.CMV-eGFP lentiviruses (c, f). Plots of eGFP-positive cells represent cells infected with either pTRIP ΔU3.Rip405-eGFP or pTRIP ΔU3.CMV-eGFP viral vectors. Equivalent amounts of viral particles were used according to the capsid antigen p24 contents of viral stocks (200 ng of p24). Region areas selected were chosen to include eGFP-expressing cells above the autofluorescence of untransduced Min6 and 293T cells as negative control. Min6 and 293T cells were infected with serial dilutions of lentiviral stocks to determine the eGFP-titres. The transduction unit (TU) values indicate the number of eGFP-positive cells/ml of viral stock. TU are reported below each FACS plot and were calculated as described in Materials and methods



virus (Fig. 1e). In contrast, both cell lines were transduced by the pTRIP ΔU3.CMV-eGFP (Fig. 1c, f). These results demonstrate that, in a lentiviral context, the RIP405 directs cell-specific expression in insulin-producing cells.

Development of rat embryonic pancreases engrafted in mice To determine whether stem/progenitor cells infected with lentiviral vectors are capable of producing modified mature beta cells, we generated an ex vivo model of rat beta cell differentiation. This model enabled us to investigate the ability of immature pancreatic tissue to grow and develop when engrafted into *scid* mice. Rat pancreatic rudiments were dissected from either 13.5 (E13.5) or 16.5 (E16.5)-day-old embryos to obtain tissues containing progenitor cells at two developmental stages. Prior to the grafting of these pancreases, we characterised the presence of endocrine and exocrine tissue in the explant by immunofluorescence analysis. In accordance with previously reported results [34], at E16.5 the vast majority of the endocrine cells in the pancreas are glucagon-expressing cells, in addition to rare insulin-expressing cells (Fig. 2a). Moreover, carboxypeptidase A (CPA)-expressing cells were found dispersed in the tissue and did not display typical acinar morphology (Fig. 2c). E16.5 pancreases were transplanted under the kidney capsule of *scid* mice and analysed 7 days later (Fig. 2b, d). During this period, numerous CPA-expressing cells developed and associated to form acinar structures (Fig. 2d). Under these conditions, insulin-expressing cells also developed and were found associated with glucagon-expressing cells, forming clusters with a similar morphology to that of islets of Langerhans (Fig. 2b). This increase in the number of differentiated mature beta cells was accompanied by a 250-fold increase in insulin content of the graft as measured by radioimmunoassay (data not shown).

The increase in beta cell mass during the transplantation period could be due either to the proliferation of the rare existing insulin-expressing cells, or to the differentiation of progenitor cells into mature beta cells. To discern between the two possibilities, we thus repeated the transplantation experiments with E13.5 pancreases, which do not contain beta cells at this stage (Fig. 2e), whereas, glucagon-expressing cells (Fig. 2e) or CPA-containing cells (Fig. 2g) are barely present. Transplantation of these pancreases was performed as previously described and analysed 7 days later (Fig. 2f, h). Exocrine tissue developed as revealed by the detection of CPA-expressing cells with normal acinar morphology (Fig. 2h). In addition, we observed insulin- and glucagon-expressing cells forming structures resembling islets of Langerhans (Fig. 2f). These results clearly indicate that the increase of the beta cell mass observed in our model is mainly due to the differentiation and not the proliferation of pre-existing beta cells.

Together, these data demonstrate that we generated a functional ex vivo model for rat pancreatic development. When engrafted under the kidney capsule of *scid* mice, E13.5 and E16.5 immature pancreases develop into endocrine and exocrine tissues with normal morphology.

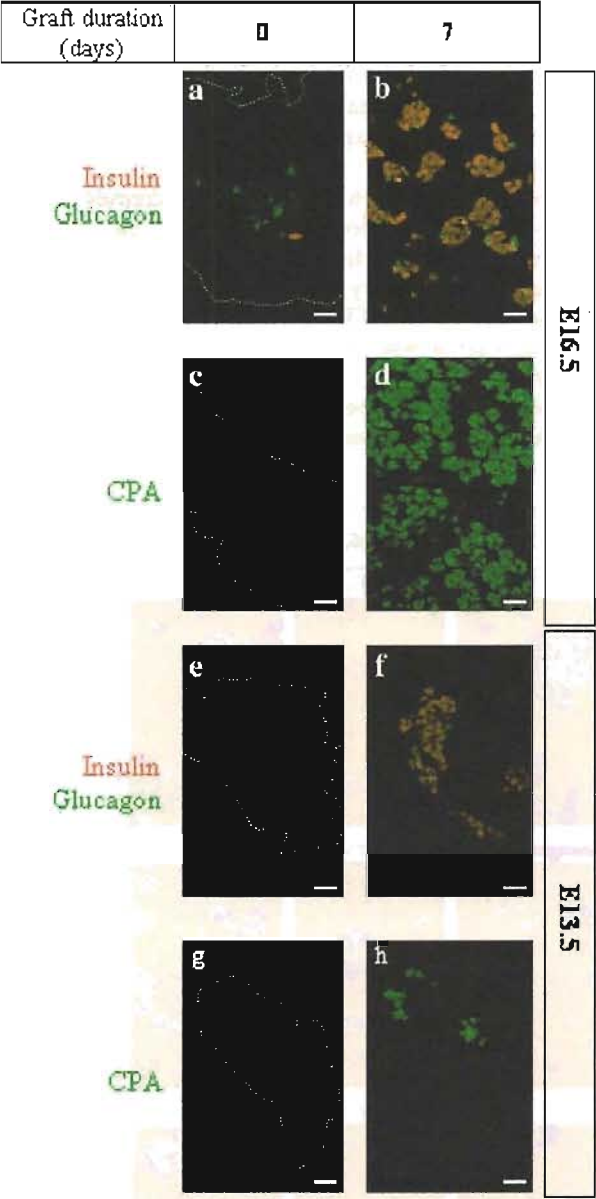


Fig. 2 Development of rat embryonic pancreases engrafted in *scid* mice. Endocrine cells in E16.5 pancreases were mainly glucagon-positive cells (green) with rare dispersed insulin-positive cells (red; red arrow) (a). A few exocrine cells were detectable by CPA immunostaining (green), but did not form acinar structures (c). Seven days after transplantation, numerous insulin-positive cells were detected (red) associated with glucagon-expressing cells (green) to form islets of Langerhans (b). CPA-positive cells (green) form clusters similar to acini (d). At E13.5, no insulin or CPA-expressing cells were detected (e, g) before grafting. Rare glucagon-positive cells (green) were present and dispersed (e). Seven days after transplantation, endocrine insulin (f) (red), glucagon (green) and exocrine (CPA, green) (h) cells were detected with a morphology similar to that of islets of Langerhans or acini. The contours of the pancreatic rudiments are indicated as a dotted line. Scale bar 50 μm

Transduction with recombinant lentiviruses mediates long-term expression of cell-type-specific eGFP expression in insulin-positive cells In our in vivo model, we sought to determine whether recombinant lentiviruses can infect

progenitor cells that will differentiate into beta cells specifically expressing the transgene. E13.5 and E16.5 pancreases were infected with the pTRIP ΔU3.RIP405-eGFP vector, grafted and analysed 7 days later. Under these conditions, no eGFP-expressing cells were detected (data not shown).

We next infected E16.5 immature pancreases that were partially dissociated prior to infection and transplantation. We reasoned that the dissociation of the pancreas would increase the accessibility of the viral particles to the epithelium and thus allow eGFP expression. Using this technique, eGFP expression was observed in insulin-containing cells (Fig. 3a).

To define the cell types expressing eGFP in the infected pancreases that developed in the *scid* mice, double immuno-

labelling was performed using antibodies directed against insulin (beta cells), glucagon (alpha cells), pan-cytokeratin (duct cells), or carboxypeptidase-A (acinar cells) in combination with anti-eGFP. As shown in Fig. 3a, 7 days after transplantation eGFP was clearly detected in insulin-expressing cells, while eGFP was never detected in glucagon-expressing cells (Fig. 3b), pan-cytokeratin-expressing cells (Fig. 3c) or CPA-expressing cells (Fig. 3d). We also analysed the grafts 1 month after transplantation. As shown in Fig. 3e, sustained beta cell expression of eGFP was achieved.

To rule out the possibility that the eGFP-labelled insulin-expressing cells originated from the rare insulin-expressing cells present before transplantation in E16.5 pancreases (Fig. 2a), we used E13.5 pancreases, which lack these pre-existing beta cells (Fig. 2e). As shown in Fig. 4, 7 days after transplantation, eGFP was present in beta cells that have clearly differentiated in this model.

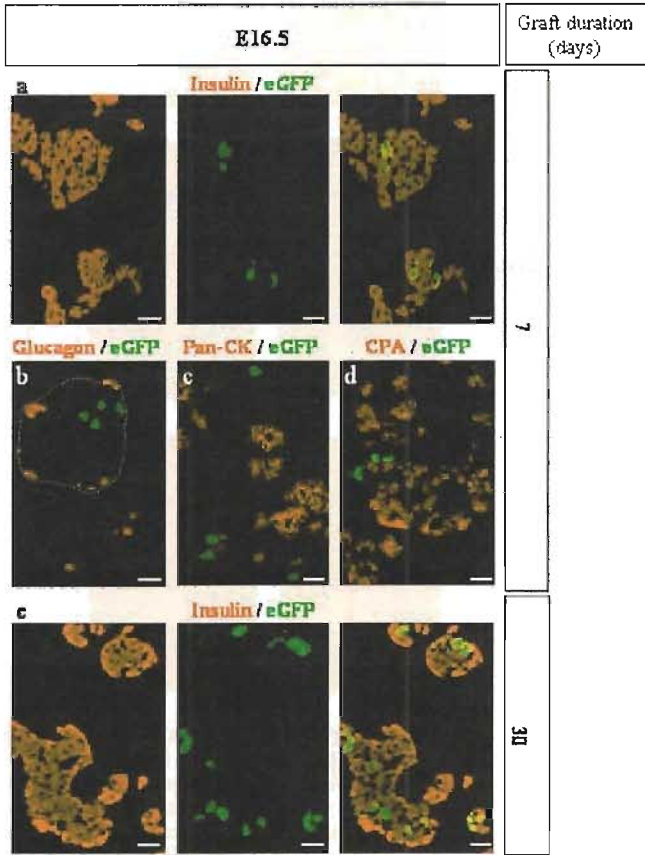


Fig. 3 Restricted expression of eGFP in insulin-positive cells and long-term expression after infection with recombinant lentiviruses. E16.5 pancreases were partially dissociated, infected with lentiviruses expressing eGFP under the control of the insulin promoter (pTrip ΔU3.RIP405-eGFP) (120 ng of p24), grafted in *scid* mice and analysed 7 (a, b, c, d) or 30 (e) days after transplantation. a, e Immunodetection of insulin (red, left panel), eGFP (green, middle panel) and merge of both stainings (right panel). All eGFP-positive cells were insulin-positive 7 or 30 days after transplantation. b Immunodetection of glucagon (red) and eGFP (green). The contour of an islet of Langerhans is represented as a dotted line. c Immunodetection of pan-cytokeratin (red) and eGFP (green). d Immunodetection of CPA (red) and eGFP (green). Note that the eGFP staining was found in nuclear and cytoplasmic compartments. No eGFP-positive cells were identified as alpha cells, duct cells or acinar cells (b, c, d). Scale bar 50 μm

Highly efficient lentiviral transduction of immature pancreatic rudiments As described above, the pTRIP ΔU3.RIP405-eGFP vector transduces E13.5 and E16.5 pancreatic rudiments, with eGFP transgene expression being restricted to insulin-producing cells. However, the transduction efficiency was less than 5% of the insulin-containing cells.

To improve the transduction efficiency, we used an organotypical culture model of E13.5 rat pancreatic epithelium, where both the accessibility of the viral particles to the epithelium and endocrine cell differentiation are favoured. At E13.5 in rats, the pancreatic primordium consists of a central epithelial bud surrounded by a considerable amount of mesenchymal tissue. We and others previously demonstrated that the mesenchymal tissue is not necessary for the differentiation of the epithelium into beta cells [26, 27]. Therefore, the mesenchymal tissue was removed. The isolated pancreatic epithelium was infected with the lentiviral vectors, pTRIP ΔU3.CMV-eGFP and pTRIP ΔU3.RIP405-eGFP for 2 h and cultured in conditions that

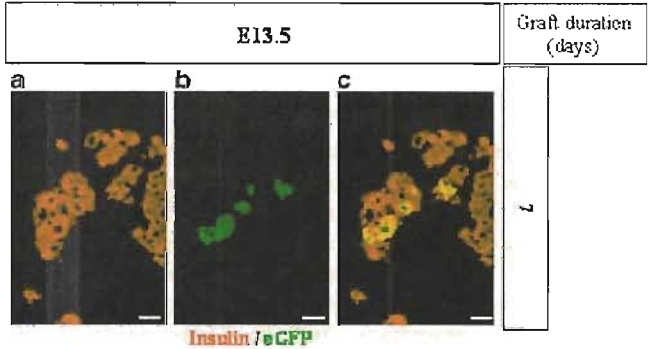


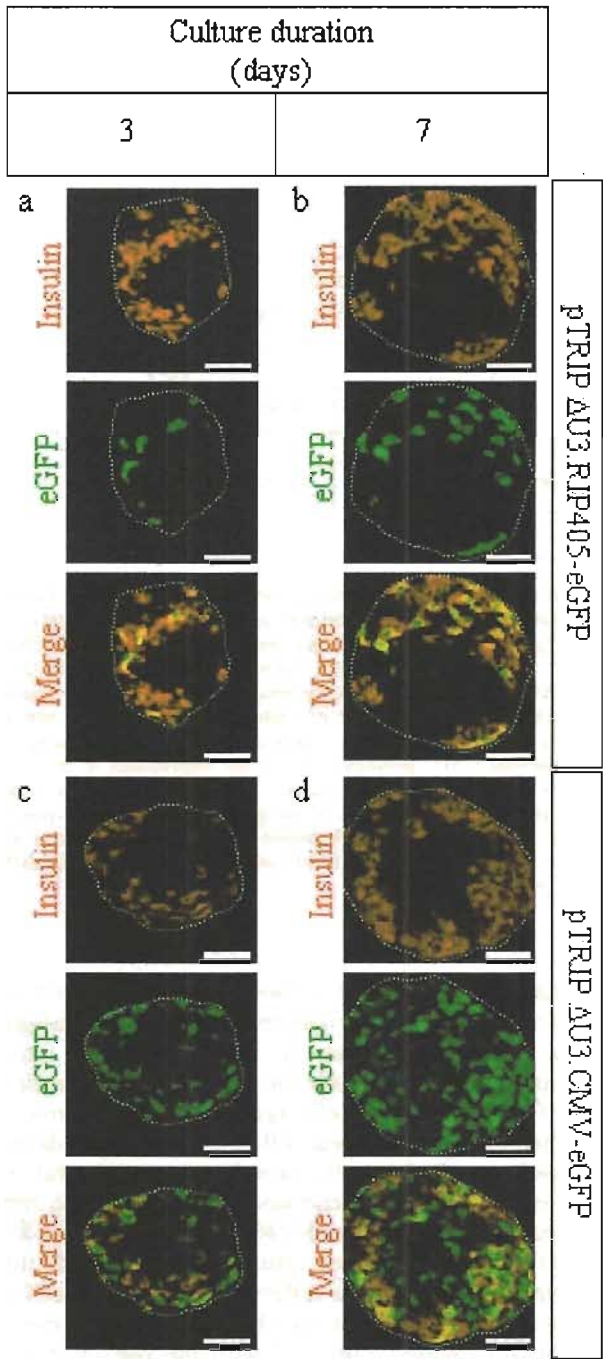
Fig. 4 Restricted expression of eGFP in insulin-positive cells after infection of immature pancreases that lack beta cells. E13.5 pancreases that lacked insulin-expressing cells were partially dissociated, infected with pTrip ΔU3.RIP405-eGFP (120 ng of p24) and grafted to *scid* mice. Seven days after transplantation, numerous insulin-positive cells (red) (a) that had differentiated were eGFP-positive (b). c The merged images from a and b. Note that the eGFP staining was found both in nuclear and cytoplasmic compartments, while insulin staining was restricted to the cytoplasmic compartment. Scale bar 50 μm

simulate pancreatic differentiation [27, 35]. To evaluate the transduction yield of both vectors, double immunofluorescence detection of insulin and eGFP was performed after 3 and 7 days of culture. We observed insulin-expressing cells after 3 days in culture (Fig. 5a, c) and a further increase in the number of differentiated beta cells was detected after 7 days (Fig. 5b, d). In explants infected with pTRIP ΔU3.RIP405-eGFP vector, we observed that all of the eGFP-expressing cells stained positive for insulin (Fig. 5a, b; Fig. 6a, b left panel). Moreover, the variation of eGFP expression during the culture period was concomitant and parallel to that observed for insulin. The ratio of

insulin-positive cells versus the total number of cells increased from 20.2 to 46.0% between day 3 and day 7 of culture (Fig. 6b, left panel), and a similar variation of 9.7–32.4% was observed for the percentage of eGFP-expressing cells relative to the total number of cells (Fig. 6a, left panel). Finally, the transduction yield of insulin-positive cells was highly efficient, since 7 days after infection 70.4% of insulin-expressing cells co-expressed eGFP (Fig. 6b, left panel).

The explants were infected in parallel with viruses where eGFP transcription was under the control of the CMV promoter and cultured for 3 or 7 days. As shown in Fig. 5c and d, a large number of eGFP-expressing cells that stained either positive or negative for insulin were observed, reflecting the ubiquitous expression feature of the CMV promoter. In addition, the percentage of eGFP-positive cells relative to the total number of cells was not significantly different after 3 or 7 days in culture (33.8 and 41.3%, respectively; Fig. 6b, right panel). This demonstrates that in our organotypical culture model, the ubiquitous CMV promoter drives the expression of a transgene in a manner independent of the differentiation status.

Beta cells expressing eGFP derive from infected progenitors To further demonstrate that lentiviral vectors could target endocrine progenitors, E13.5 pancreatic epithelia were infected with the pTRIP ΔU3.CMV-eGFP lentiviral vector. After 24 h in culture, both double in situ hybridisation and in situ hybridisation coupled with immunofluorescence labelling were performed to delineate whether a portion of the eGFP-positive cells co-expressed *ngn3*, a marker of endocrine progenitor cells [36, 37]. First we addressed the specificity of *ngn3* detection by in situ hybridisation. As observed in Fig. 7a, the use of an antisense *ngn3* riboprobe resulted in the detection of clearly labelled cells whereas no signal was observed with the sense *ngn3* riboprobe (Fig. 7b). We next performed double in situ hybridisation where the eGFP mRNA was first revealed in red (Fig. 7c) and the *ngn3* mRNA was subsequently visualised in blue on the same section (Fig. 7d). Our results clearly illustrate that numerous eGFP-expressing cells are indeed *ngn3* progenitor cells. Similar results were obtained with a different method, in which eGFP immunofluorescence de-



◀ **Fig. 5** High-efficiency lentiviral transduction of immature pancreatic rudiments that developed in culture. E13.5 pancreatic rudiments were depleted of their surrounding mesenchyme, infected with either pTRIP ΔU3.RIP405-eGFP (85 ng of p24), or pTRIP ΔU3.CMV-eGFP (120 ng of p24), and cultured in a collagen matrix. Confocal dual immunofluorescence detection was performed on both insulin (red) and eGFP (green) after 3 or 7 days in culture on 10-μm cryosections. After 3 days in culture, insulin-positive cells were detected (a, c). A marked increase in the number of insulin-expressing cells was observed after 7 days in culture (b, d). Upon infection with the pTRIP ΔU3.RIP405-eGFP, the eGFP and insulin expression kinetics were similar; all eGFP-expressing cells stained positive for insulin (a, b). The use of a ubiquitous promoter (pTRIP ΔU3.CMV-eGFP) allowed efficient eGFP expression after 3 (c) or 7 (d) days in culture. Numerous eGFP-positive cells (c, d) were either insulin-positive or negative. The contours of the pancreatic explants are indicated as a dotted line. Scale bar 50 μm

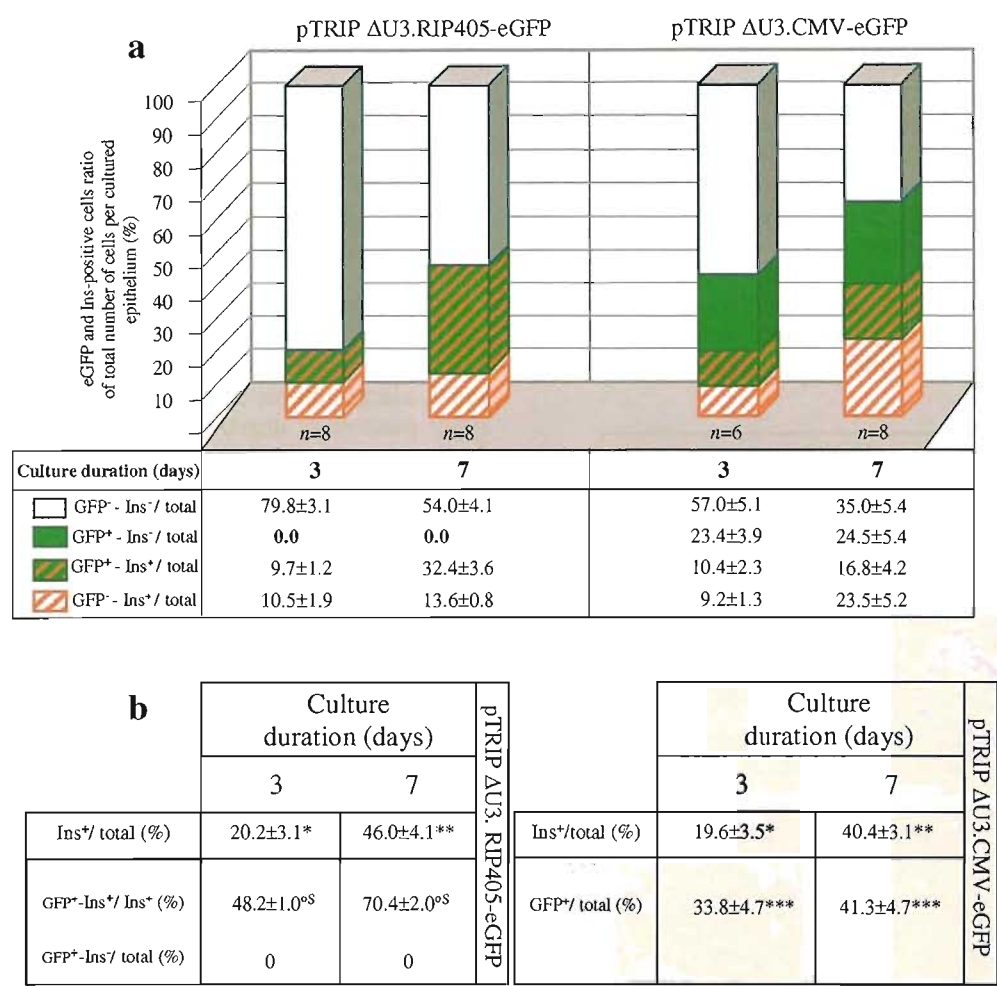


Fig. 6 Quantitative analysis of transduction yield. E13.5 depleted pancreatic epithelia were infected with either pTRIP ΔU3.RIP405-eGFP (85 ng of p24) or pTRIP ΔU3.CMV-eGFP (120 ng of p24) viruses and cultured for 3 or 7 days. The epithelia for each experimental culture condition were sectioned and the total number of cells was counted after nucleus staining. Dual immunofluorescence analysis was performed on the sections to visualise eGFP- and insulin-positive cells. The merge of both fluorescent markers revealed four different types of cells and the number of cells in each population was determined. **a** The diagram displays the percentage of each population relative to the total number of cells. The used values are presented in a table below the diagram and represent means±SEM. *n* represents the number of independent infected epithelia used for each condition. **b** Mean values displayed a Gaussian

distribution, thus allowing Student's *t*-test statistical analysis. Pairwise comparisons were performed. Insulin development after 3 (**p*=0.448) or 7 (***p*=0.155) days in culture was not significantly different between the two types of viral vectors. After infection with the pTRIP ΔU3.CMV-eGFP virus, the relative amount of eGFP-positive cells versus the total number of cells (***p*=0.148) was not significantly different after 3 or 7 days in culture, demonstrating that the ubiquitous CMV promoter drives the expression of the eGFP transgene in a manner independent of the differentiation status. Finally, the observed increase of the proportion of insulin-positive cells that co-expressed eGFP between 3 and 7 days in culture after infection with pTRIP ΔU3.RIP405-eGFP was significantly different (^o*p*<0.001)

tection was achieved after *ngn3* in situ hybridisation staining (Fig. 7e–g).

Discussion

In this study, we have demonstrated that recombinant lentiviral vectors can efficiently infect pancreatic progenitor cells and thereby stably modify mature rat pancreatic beta cells. During the past years, different approaches have been used to genetically modify beta cells with two major objectives: beta cell protection against immune destruction;

and beta cell expansion. For these purposes, recombinant DNA was transferred into mature beta cells using different vectors, such as adenoviruses, adeno-associated viruses and lentiviruses [38]. While progress has been made in ways of protecting beta cells against immune destruction [10], attempts to expand beta cells by gene transfer directly into insulin-producing cells have been unsuccessful. For example, beta cell lines generated by infection with retroviral vectors expressing the SV40 large T antigen, H-RAS and hTERT oncogenes lose insulin expression with time, suggesting that the cells de-differentiate [39]. Beta cell differentiation could be reactivated by transfection of specific transcription factors combined with the use of specific

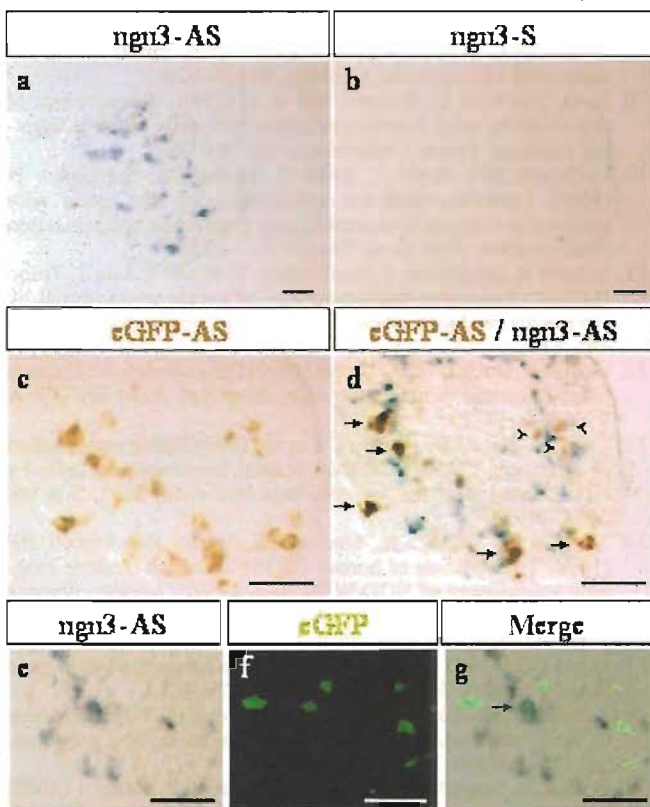


Fig. 7 Neurogenin 3 endocrine progenitor cells can be transduced by recombinant lentiviruses. E13.5 pancreatic rudiments were depleted of their surrounding mesenchyme, infected with pTRIP ΔU3. CMV-eGFP (120 ng of p24), and cultured for 24 h in a collagen matrix. Single in situ hybridisation was performed on 10-μm cryosections to detect neurogenin 3 (*ngn3*) expression. The specificity of *ngn3* detection was addressed by comparing in situ hybridisation labelling with either antisense (**a**) (*ngn3*-AS) or sense (**b**) (*ngn3*-S) *ngn3* riboprobes. Double in situ hybridisation was performed allowing dual detection of eGFP and *ngn3*. The eGFP staining was first visualised (**c**) prior to *ngn3* labelling (**d**). Three types of labelled cells (**d**) were observed: *ngn3* single-labelled cells (blue); eGFP single-labelled cells (*black arrowheads*); and eGFP/*ngn3* double-labelled cells (*black arrows*). Note that when double in situ hybridisation was performed using eGFP-AS and *ngn3*-S probes, no *ngn3* blue staining was observed (data not shown). **e–g** Immunofluorescence detection of eGFP was achieved after *ngn3* labelling by in situ hybridisation. These panels show **e** *ngn3* in situ hybridisation staining, **f** eGFP immunofluorescence labelling, and **g** the merged images. The *black arrow* (**g**) points to an eGFP/*ngn3* double-labelled cell. Scale bar 50 μm

growth factors. However, even in such conditions, the levels of insulin expression remained low when compared to mature beta cells [40]. Other investigators were unable to stably immortalise beta cells using lentiviruses expressing the SV40 T antigen [11]. Although gene transfer was efficient, the inability to obtain an immortalised cell line may be due to the use of mature beta cells as infected target cells. To circumvent this limitation, we have addressed here the use of lentiviral vectors as a tool to stably transduce pancreatic endocrine progenitor cells, instead of mature beta cells.

We designed an ex vivo transplantation experimental model in which progenitor cells differentiate into beta cells.

We grafted embryonic pancreases under the kidney capsule of immuno-incompetent mice. This grafting site has been shown to permit the development of a large number of tissues, such as rodent thymus, bovine adrenocortical cells and human embryonic and fetal pancreases [29, 30, 40, 41]. Within 1 week after transplantation of E16.5 pancreases, the insulin content was multiplied by a factor of 250. Such a beta cell increase could not be due to the proliferation of the few pre-existing insulin-expressing cells for the following reasons. First, beta cell proliferation is very limited during prenatal development [42]. Second, it is now clearly established that the rare insulin-expressing cells present during development of the embryonic pancreas and which frequently co-express glucagon are not the progenitors of mature beta cells [42, 43]. Lastly, E13.5 pancreases that do not contain beta cells develop into beta cells when grafted to *scid* mice (the present work). Thus, our data indicate that the observed development of endocrine tissue in our ex vivo experimental model is due to the differentiation of progenitor cells originally present in the transplanted tissue.

In order to infect the pancreatic progenitor cells and subsequently transduce mature beta cells, access of the virus to the progenitor cell population is a crucial experimental step. There are different arguments indicating that pancreatic progenitor cells are located in the centre of the pancreatic tissue: (1) during embryonic life, the cells expressing *ngn3*, a marker of endocrine pancreatic progenitor cells, are located in the central region of the developing pancreas that corresponds to the pancreatic epithelium [36, 44–46]; (2) the first insulin-expressing cells also appear in the central region of the pancreas [47]. However, it is well established that in compact tissues, the accessibility of viral particles to cells located in the centre of the tissue is poor [3]. We show here that by partially dissociating pancreases, we increase the probability of contact between the virus and the progenitor cells and demonstrate that progenitor cells that differentiate into beta cells can indeed be infected. The infection yield of progenitors was further enhanced by direct exposure of purified embryonic pancreatic epithelium to the viruses upon removal of the surrounding mesenchyme.

As discussed above, our data indicate that the beta cells expressing eGFP derived from the infection of progenitor cells that differentiate into beta cells rather than from the infection of pre-existing beta cells that proliferate. It was, therefore, of crucial importance to characterise the nature of the cells that were the primary cell target infected by the lentiviral vectors. We showed that numerous *ngn3*-positive cells expressed eGFP 24 h after infection with a lentiviral vector, in which eGFP expression was under the control of the ubiquitous CMV promoter. This demonstrates that endocrine progenitor cells can be infected and a restricted transgene expression obtained according to the specificity of the promoter.

The experimental process described here represents a powerful tool for gain-of-function experiments in a dynamic developmental model that can allow promoter-specific targeting throughout the entire cell differentiation cascade in the pancreas. In addition, our model is also appropriate for loss-of-function studies, since recent data have shown that

RNA interference can be efficiently performed using lentiviral vectors [48–50].

We designed, in this study, a new model that resembles those used *in vivo* to produce rodent beta cell lines. In these cases, insulinomas were produced from transgenic mice expressing an oncogene under the control of the insulin promoter allowing the expression of the transgene specifically in mature beta cells [24, 51]. This approach was used to generate rodent beta cell lines that were functional in terms of insulin secretion upon glucose stimulation. However, the beta cell lines were obtained by gene transfer in fertilised eggs, which restricts its application to animal models without any possible transfer to humans. The model presented here is based on *ex vivo* gene transfer, which is applicable to both animal and human tissues. Recently, we designed an *ex vivo* system, where human embryonic pancreases can develop into mature pancreatic tissues [29]. Such a model will now be used to test the feasibility of infecting human pancreatic progenitor cells with a specific expression of the transgene in mature human beta cells.

Acknowledgements The first two authors contributed equally to this work. This work was supported by the Juvenile Diabetes Research Foundation (JDRF Center for Beta Cell Therapy in Europe), INSERM/Fondation pour la Recherche Médicale/Juvenile Diabetes Research Foundation (4DA03H), the Association Française des Diabétiques (AFD), the Fondation pour la Recherche Médicale, INSERM, the region Ile de France, Retina France and the University Paris VI.

The authors are deeply grateful to Yasmine Hazhouz, Emilie Neveu, Isabelle LeNin and Stephanie Bauchet for technical assistance and to Medeva Ghee and Chamsy Sarkis for helpful comments and critical reading of the manuscript. Muriel Castaing was successively supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) and by l'Association d'Aide aux Jeunes Diabétiques (AJD). Aline Guerci was successively supported by the Ministère de la Recherche et de la Technologie and by the FRM.

References

- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA et al (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343:230–238
- Halban PA, Kahn SE, Lernmark A, Rhodes CJ (2001) Gene and cell-replacement therapy in the treatment of type 1 diabetes: how high must the standards be set? *Diabetes* 50:2181–2191
- Leibowitz G, Beattie GM, Kafri T et al (1999) Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. *Diabetes* 48:745–753
- Csete ME, Benhamou PY, Drazan KE et al (1995) Efficient gene transfer to pancreatic islets mediated by adenoviral vectors. *Transplantation* 59:263–268
- Becker TC, BeltrandelRio H, Noel RJ, Johnson JH, Newgard CB (1994) Overexpression of hexokinase I in isolated islets of Langerhans via recombinant adenovirus. Enhancement of glucose metabolism and insulin secretion at basal but not stimulatory glucose levels. *J Biol Chem* 269:21234–21238
- Verma IM, Somia N (1997) Gene therapy—promises, problems and prospects. *Nature* 389:239–242
- Kapturczak M, Zolotukhin S, Cross J et al (2002) Transduction of human and mouse pancreatic islet cells using a bicistronic recombinant adeno-associated viral vector. *Mol Ther* 5:154–160
- Flotte T, Agarwal A, Wang J et al (2001) Efficient *ex vivo* transduction of pancreatic islet cells with recombinant adeno-associated virus vectors. *Diabetes* 50:515–520
- Ju Q, Edelstein D, Brendel MD et al (1998) Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector. *Diabetologia* 41:736–739
- Gallichan WS, Kafri T, Krah T, Verma IM, Sarvetnick N (1998) Lentivirus-mediated transduction of islet grafts with interleukin 4 results in sustained gene expression and protection from insulinitis. *Hum Gene Ther* 9:2717–2726
- Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D (2000) Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* 2:404–414
- Uchida N, Buck DW, He D et al (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14720–14725
- Case SS, Price MA, Jordan CT et al (1999) Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2988–2993
- Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE (1999) Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283:682–686
- Evans JT, Kelly PF, O'Neill E, Garcia JV (1999) Human cord blood CD34+CD38-cell transduction via lentivirus-based gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 10:1479–1489
- Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME et al (2001) Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. *Science* 294:2368–2371
- Buchet D, Serguera C, Zennou V, Charneau P, Mallet J (2002) Long-term expression of beta-glucuronidase by genetically modified human neural progenitor cells grafted into the mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 19:389–401
- Flax JD, Aurora S, Yang C et al (1998) Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat Biotechnol* 16:1033–1039
- Englund U, Ericson C, Rosenblad C et al (2000) The use of a recombinant lentiviral vector for *ex vivo* gene transfer into the rat CNS. *NeuroReport* 11:3973–3977
- Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhass U, Montagnier L, Charneau P (2000) HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101:173–185
- Sanvito F, Nichols A, Herrera P et al (1995) TGF- β 1 overexpression in murine pancreas induces chronic pancreatitis and, together with TNF- α , triggers insulin-dependent diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 217:1279–1286
- Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nat Biotechnol* 15:871–875
- Yee JK, Miyanojara A, LaPorte P, Bouic K, Burns JC, Friedmann T (1994) A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9564–9568
- Miyazaki J, Araki K, Yamato E et al (1990) Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127:126–132
- Gregory LG, Harbottle RP, Lawrence L, Knapton HJ, Themis M, Coutelle C (2003) Enhancement of adenovirus-mediated gene transfer to the airways by DEAE dextran and sodium caprate *in vivo*. *Mol Ther* 7:19–26
- Gittes G, Galante P, Hanahan D, Rutter W, Debas H (1996) Lineage specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 122:439–447
- Miralles F, Czernichow P, Scharfmann R (1998) Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* 125:1017–1024

28. Rachdi L, Marie JC, Scharfmann R (2003) Role for VPAC2 receptor-mediated signals in pancreas development. *Diabetes* 52:85–92
29. Castaing M, Peault B, Basmaciogullari A, Casal I, Czernichow P, Scharfmann R (2001) Blood glucose normalization upon transplantation of human embryonic pancreas into beta-cell-deficient SCID mice. *Diabetologia* 44:2066–2076
30. Thomas M, Northrup SR, Hornsby PJ (1997) Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. *Nat Med* 3:978–983
31. Cras-Meneur C, Elghazi L, Czernichow P, Scharfmann R (2001) Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. *Diabetes* 50:1571–1579
32. Ravassard P, Chatail F, Mallet J, 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
33. Herzog E, Bellenchi GC, Gras C et al (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21:RC181
34. Rall LB, Pictet RL, Williams RH, Rutter WJ (1973) Early differentiation of glucagon-producing cells in embryonic pancreas: a possible developmental role for glucagon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:3478–3482
35. Miralles F, Serup P, Cluzeaud F, Vandewalle A, Czernichow P, Scharfmann R (1999) Characterization of beta cells developed in vitro from rat embryonic pancreatic epithelium. *Dev Dyn* 214:116–126
36. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F (2000) Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1607–1611
37. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129:2447–2457
38. Demeterco C, Levine F (2001) Gene therapy for diabetes. *Front Biosci* 6:D175–D191
39. De la Tour D, Halvorsen T, Demeterco C et al (2001) Beta-cell differentiation from a human pancreatic cell line in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 15:476–483
40. Hoffmann MW, Allison J, Miller JF (1992) Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2526–2530
41. Hayek A, Beattie GM (1997) Experimental transplantation of human fetal and adult pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2471–2475
42. Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T et al (2000) Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 49:163–176
43. Herrera PL (2000) Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127:2317–2322
44. Gu G, Brown JR, Melton DA (2003) Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 120:35–43
45. Apelqvist A, Li H, Sommer L et al (1999) Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400:877–881
46. Lee JC, Smith SB, Watada H et al (2001) Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* 50:928–936
47. Polak M, Bouchareb-Banaei L, Scharfmann R, Czernichow P (2000) Early pattern of differentiation in the human pancreas. *Diabetes* 49:225–232
48. Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, Pralong W, Aebischer P (2002) Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther* 13:2197–2201
49. Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV et al (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33:401–406
50. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D et al (2003) Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* 9:493–501
51. Efrat S, Linde S, Kofod H et al (1988) β Cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9037–9041

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les stratégies mises en œuvre pour la compréhension des mécanismes impliqués dans le diabète de type I ainsi que pour mettre au point des traitements de réparation, de protection ou de remplacement des cellules atteintes sont nombreuses.

Depuis quelques années, la recherche clinique et appliquée effectue de réels progrès dans un but de protéger les cellules β contre la destruction auto-immune (Gallichan *et al.*, 1998; Kapturczak *et al.*, 2001; McCabe *et al.*, 2006).

En revanche, les tentatives d'obtention des quantités toujours renouvelables de cellules β se sont principalement intéressées à faire proliférer des cellules préexistantes aussi bien chez le rongeur (Brelje et Sorenson, 1991; Otonkoski *et al.*, 1999) que chez l'homme (Otonkoski *et al.*, 1994). Par transfert direct de gène tels que l'antigène grand T de SV40 (Salmon *et al.*, 2000), ou les oncogènes H-RAS et hTERT (Halvorsen *et al.*, 1999), les cellules productrices d'insuline se trouvent souvent engagées dans un processus de tumorigénèse, en phase de transformation ou en cours d'immortalisation (crise). Ces modifications entraînent une perte progressive de la capacité de produire de l'insuline suggérant fortement que ces cellules transduites ont modifié leur phénotype comme si elles avaient subi une dédifférenciation (de la Tour *et al.*, 2001). Afin d'empêcher la perte de phénotype β , des expériences de récupération de ce phénotype combinant la co-transfection stable de facteurs de transcription spécifiques (pdx1 par exemple) et l'ajout de facteurs spécifiques de croissance en culture ont été réalisées. Cependant la récupération n'est que partielle : les niveaux d'expression d'insuline restent très inférieurs à ceux d'une cellule bêta mature.

Ainsi les nombreuses tentatives utilisant ce type d'approche, se sont soldées par l'incapacité d'obtenir les lignées β matures immortalisées possédant toutes leurs propriétés et ce malgré l'efficacité du transfert de gène. Ces échecs résident peut être dans l'utilisation de cellules déjà différenciées comme matériel initial.

Il est intéressant de souligner l'existence de la génération de lignées cellulaires " β -like", fonctionnelles en termes de sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation glucosique. Ces lignées ont été obtenues à partir de souris transgéniques développant des insulinomes par expression d'un oncogène sous contrôle d'un fragment du promoteur de l'insuline (Efrat *et al.*, 1988; Miyazaki *et al.*, 1990; Ishihara *et al.*, 1993). Les lignées établies par ce type d'approche ont donc été obtenues par le transfert de gène à des stades très précoces du développement, assurant l'expression du gène d'immortalisation dès les prémices de l'activation des séquences

promotrices du gène de l'insuline. La raison principale du succès d'obtention de ces lignées cellulaires réside probablement dans le fait que le processus d'immortalisation a lieu dans la phase d'ontogenèse des cellules β et non à partir d'îlots pancréatiques adultes comme dans certaines tentatives infructueuses. Cette application encourageante limite toutefois son application aux modèles animaux transgéniques sans qu'il ne soit possible de la transférer dans un but thérapeutique à l'homme. Cependant, comme nous possédons les modèles permettant l'accès aux cellules progéniteurs/souches endocrines (murines et humaines) et mimant leur développement, il nous paraissait très intéressant d'évaluer leur potentiel pour générer de telles lignées. Compte-tenu de leurs caractéristiques multipotentes et immatures, il est envisageable d'obtenir des résultats similaires à ceux obtenus par transgénèse.

Dans cet axe, notre objectif initial était de démontrer la capacité de transférer efficacement un gène dans des cellules progéniteurs/souches pancréatique tout en restreignant son expression dans les cellules différenciées à savoir ici les cellules β matures. Nous avons opté pour l'approche novatrice utilisant des vecteurs lentiviraux pan-tropiques permettant d'infecter les cellules épithéliales pancréatiques immatures de sorte que le transgène soit exprimé de façon constitutive uniquement après leur différenciation en cellules β matures.

Pour atteindre notre objectif, nous avons besoin : (i) d'avoir accès à des tissus pancréatiques embryonnaires immatures enrichis en cellules progéniteur/souches endocrines ; (ii) d'être capable de résumer *ex-vivo* le développement d'ébauches pancréatiques ; (iii) d'un système de transfert de gène efficace.

Nous avons employé comme matériel biologique des pancréas embryonnaires humains issus d'IVG et utilisé l'expertise du laboratoire de Raphaël Scharfmann dans le domaine de greffe sous la capsule rénale de pancréas embryonnaires humains issu d'IVG. Ce modèle de xénogreffe permet de résumer parfaitement le développement du tissu pancréatique comme décrit par Castaing et al. (Castaing *et al.*, 2001). Cependant, les premiers résultats de transduction dans le modèle de greffe n'ont pas permis de détecter des cellules endocrines transduites dans un greffon de pancréas humain infecté.

Cependant les problèmes rencontrés dans les études préliminaires de ce projet n'étaient probablement pas dû à l'utilisation de vecteurs viraux car d'autres études avaient déjà démontré la faisabilité de transduction de cellules endocrines pancréatiques isolées (Becker *et al.*, 1994; Csete *et al.*, 1995; Ju *et al.*, 1998; Demeterco et Levine, 2001; Flotte *et al.*, 2001; Kapturczak *et al.*, 2002; Ayuso *et al.*, 2004; Eum *et al.*, 2004; Kobinger *et al.*, 2004; Narushima *et al.*, 2004).

En revanche, notre approche diffère des autres par l'utilisation de tissus "solides", c'est-à-dire de structures compactes en 3 dimensions, et de matériel embryonnaire dépourvu de cellules endocrines matures et non d'îlots isolés ou dissociés. Seules quelques équipes sont parvenues à transduire des cellules embryonnaires de tissu solide comme le tissu nerveux (Buchet *et al.*, 2002a; Buchet *et al.*, 2002b).

Afin de contourner cet obstacle, nous avons donc décidé de mettre au point le transfert de gène sur des tissus plus faciles à obtenir, à savoir des bourgeons pancréatiques dorsaux d'embryon de rats âgés de 13 et 16 jours. Nous avons adapté le protocole de xénogreffe à du tissu murin et utilisé le second modèle de culture organotypique en matrice de collagène ou sur filtres flottants mis au point dans le laboratoire de Raphaël Scharfmann pour résoudre le problème d'accessibilité des cellules précurseurs aux particules virales.

Ainsi le modèle organotypique nous a permis de déterminer que les lentivirus construits et produits sont bien efficaces pour transduire du tissu embryonnaire murin. De plus, l'expression du transgène de ces lentivirus est spécifique des cellules positives pour le marqueur insuline.

Initialement, la xénogreffe de pancréas embryonnaires sous la capsule rénale de souris scid nous a permis de valider le modèle de développement d'ébauches pancréatiques murines tardives (E16). Nous avons utilisé par la suite des ébauches pancréatiques plus précoces, d'une part pour pouvoir comparer les deux modèles de développement (xénogreffe et culture organotypique en absence de mésenchyme), d'autre part pour vérifier que l'importante quantité de cellules exprimant l'insuline 7 jours après la greffe n'était pas due à une prolifération massive des quelques cellules insuline⁺ préexistantes. Cette dernière hypothèse est peu probable du fait de la prolifération très limitée des cellules β pendant le développement prénatal (Jensen *et al.*, 2000a); (Myriam Attali données personnelles) même si ces dernières ont conservé cette capacité qu'elles utiliseront plus tardivement pour maintenir la masse β endocrine (Dor *et al.*, 2004; Georgia et Bhushan, 2004). Afin d'invalider cette hypothèse de multiplication massive du nombre de cellules préexistantes nous avons démontré dans un premier temps qu'elle ne pouvait pas se justifier au vu de la prolifération cellulaire relative intra-greffon. De plus, il est maintenant clairement établi que les quelques rares cellules détectées à E16 co-exprimant aussi le marqueur glucagon ne sont pas à l'origine des cellules β matures (Herrera, 2000; Dor *et al.*, 2004). Dans un second temps, nous avons renouvelé les expériences en prenant comme matériel de départ des pancréas de rat (E13)

dépourvus de cellules endocrines β matures suggérant fortement que le développement de cellules endocrine détectées 7 jours après greffe (cellules insuline-positives) provient de la différenciation de cellules progénitrices.

L'étape ultérieure, cruciale, était de déterminer les conditions optimales pour effectuer un transfert de gène efficace sur tissu entier. La première difficulté réside dans la localisation probable des progéniteurs/souches au centre du tissu pancréatique. Différents arguments appuient cette hypothèse : (i) pendant la vie embryonnaire, les cellules exprimant NGN3, un marqueur des cellules pancréatiques endocriniennes progénitrices, sont situés dans la région centrale du pancréas qui correspond à l'épithélium pancréatique (Apelqvist *et al.*, 1999; Gradwohl *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2003; Duvillie *et al.*, 2006) ; (ii) les premières cellules exprimant l'insuline apparaissent également dans la région centrale du pancréas avant les étapes de morphogenèse (Polak *et al.*, 2000; Duvillie *et al.*, 2006).

La description de l'organisation d'une ébauche pancréatique embryonnaire (murine comme humaine) et la nature compacte du tissu, laissait envisager une accessibilité difficile des cellules situées dans le centre du tissu pour des particules virales, comme l'ont démontrées nos expériences préliminaires ainsi que celles effectuées par d'autres équipes (Leibowitz *et al.*, 1999); (données personnelles).

Seule l'utilisation de systèmes rendant le tissu plus "lâche" peut favoriser l'infection des cellules d'intérêt. En se basant sur cette constatation, nous avons confirmé qu'en dissociant partiellement des bourgeons pancréatiques, nous exposons davantage les cellules canalaire contenant les cellules précurseurs augmentant ainsi la probabilité de contact entre les particules virales et ces cellules. Ce qui permet de démontrer que des cellules progénitrices qui se différencient en cellules β sont "infectables". Le rendement d'infection est encore augmenté si l'on expose totalement l'épithélium pancréatique aux particules virales après l'avoir déplété de son mésenchyme, comme le montrent nos expériences sur épithéliums en culture.

De plus, en infectant un tissu totalement dépourvu de cellules endocrines matures avec un vecteur (pTRIP Δ U3.RIP405-eGFP) dont le transgène eGFP ne peut être exprimé que par des cellules β différenciées, nous avons apporté un premier argument en faveur de la capacité de nos vecteurs viraux à cibler les cellules progénitrices/souches.

Nous avons cherché à préciser les types cellulaires infectés en utilisant le seul marqueur transitoire connu, *ngn3*, assurant de façon non équivoque qu'il s'agit bien de cellules

précurseurs immatures. La cinétique d'expression de chacun des marqueurs permet de déterminer les types cellulaires concernés et préconise l'utilisation du modèle organotypique. L'infection des épithéliums par un vecteur ubiquitaire (pTRIP ΔU3.CMV-eGFP) dont l'expression du transgène est forte entraîne très rapidement une expression dans les cellules ciblées (intervalle de temps le plus court 12 à 16H entre infection et transduction). Certaines de ces cellules expriment l'ARNm *Ngn3*. La détection de cellules *ngn3*⁺ et eGFP⁺ suggère que les cellules progéniteur/souches peuvent être infectées.

L'expression différée et restreinte est assurée par l'utilisation de séquences promotrices type cellulaire-dépendantes.

Cette dernière remarque ouvre des perspectives quant à l'utilisation de ces outils pour mieux comprendre le développement du pancréas chez le rongeur ou chez l'homme, qu'il s'agisse de traçage cellulaire ou d'expériences de gain de fonction par surexpression contrôlée de chacun des marqueurs de la cascade de différenciation du pancréas endocrine.

De nouvelles approches de perte de fonction par "RNA interférence" (Goldman, 2004) peuvent alors trouver leur application par transfert de gène à l'aide de vecteurs viraux (Abbas-Terki *et al.*, 2002; Robinson *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003; Bain *et al.*, 2004; Hagerkvist *et al.*, 2005; Baeyens *et al.*, 2006) et au delà des applications thérapeutiques (Ohuchida *et al.*, 2005; Tsutsumida *et al.*, 2006).

4.1 Perspective de translation de cette application à du tissu embryonnaire humain

L'application préalable de ce protocole de transduction des cellules embryonnaires chez l'homme nécessitait de cibler une plus grande proportion de progéniteur dans le modèle de greffe qui, rappelons-le, est le seul permettant de résumer le développement du pancréas embryonnaire humain. Aux stades précoces auxquels nous avons accès (7 à 9 SG), le pancréas embryonnaire humain est constitué d'un épithélium déjà très ramifié, composé de réseaux de canaux contenant les cellules précurseurs de cellules β entourés d'un tissu mésenchymateux dense. Nous sommes en présence d'un tissu non différencié et très riche en cellules progénitrices endocrines. En effet, à ces stades, aucune cellule β différenciée n'est visible et le facteur de transcription *NEUROG3* n'est exprimé que beaucoup plus tardivement (données personnelles).

Les premiers essais préliminaires de transduction de pancréas embryonnaires humains natif (non dissociés) n'ont pas donné de résultats probants. Deux approches ont été entreprises:

- ❖ l'infection par une suspension virale d'ébauches pancréatiques humaines (7 à 9 SG) entières ou coupées en plusieurs morceaux démontre clairement la non perméabilité du tissu aux particules virales. Seule la périphérie du fragment pancréatique est transduite lorsque l'on utilise un vecteur ubiquitaire (pTRIP Δ U3.CMV-eGFP).
- ❖ l'admission d'une suspension virale à l'aide d'une canule d'injection avec contrôle du débit infiltré par une micro-pompe. Après injection en plusieurs endroits d'un greffon de quelques semaines on retrouve bien une transduction des cellules le long du trajet de la canule d'injection avec une diffusion de la suspension virale quasi-nulle.

Dans les tests préliminaires, nous ne retrouvions l'expression du transgène que dans les cellules mésenchymateuses entourant le tissu et jamais dans les canaux eux-mêmes, ce qui laissait supposer les mêmes difficultés rencontrées lors de nos mises au point sur du tissu de rat. Compte-tenu de ces résultats, nous pouvons penser qu'une des raisons principales de nos échecs de transduction dans du tissu humain était du à un manque d'accessibilité du virus aux cellules cibles.

Il est probable que le retrait du mésenchyme aurait pu résoudre en partie ce problème. Cependant, contrairement à du tissu de rat, les ébauches humaines ne peuvent être déplétées totalement de leur mésenchyme. A ces stades, la couche de cellules mésenchymateuses est déjà dense et infiltrée dans l'épithélium.

Afin de "perméabiliser" ces tissus humains, nous avons testé comme pour le tissu de rongeur plusieurs traitements enzymatiques modérés afin de les dissocier ou de dépléter partiellement. Après traitement, ces tissus ont été infectés afin d'évaluer l'effet sur la diffusion des particules virales vers le cœur des ébauches.

La difficulté est de trouver un compromis entre la dissociation du tissu permettant une accessibilité des cellules souches embryonnaires et le bon développement du greffon vers la différenciation en un tissu amphicrine fonctionnel (voir ci-dessous). Ces tests préliminaires ont permis de déterminer les conditions optimales permettant de transduire des ébauches pancréatiques humaines.

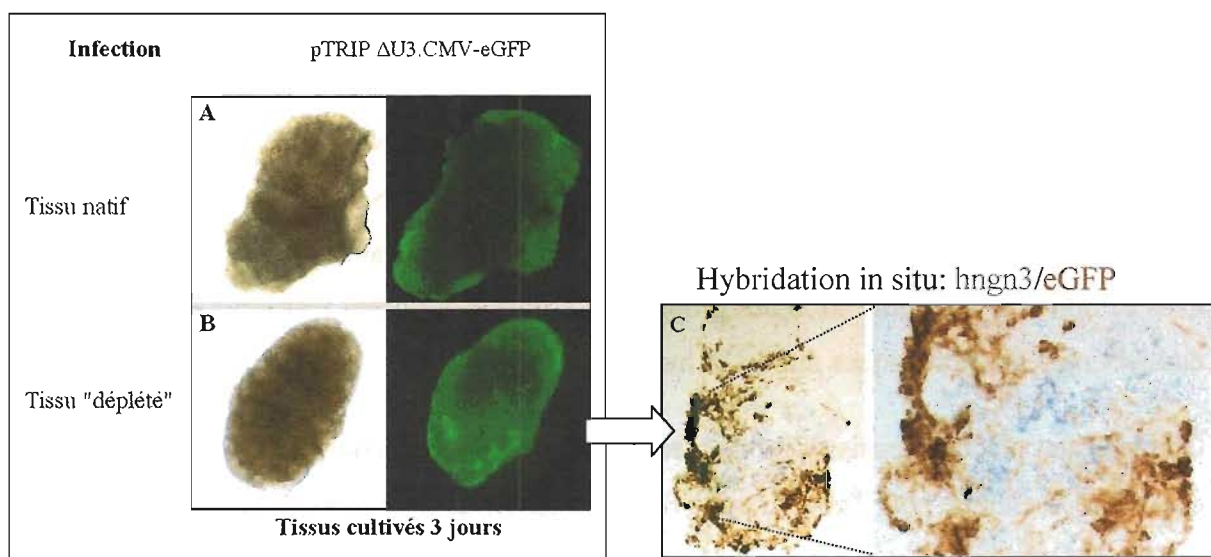


Figure 31 Transduction d'ébauche pancréatique humaine 8SG : tests préliminaires

Des ébauches pancréatiques humaines ont été coupées en deux: **(A)** Une moitié "native" ne subissant aucun traitement. **(B)** La seconde moitié a été traitée par le même protocole (déplétion ébauche de rongeurs) à savoir 20 min à la collagénase A (0,5mg/ml) et déplétion mécanique d'une partie du mésenchyme sur boîte d'agar à l'aide de la pointe d'une aiguille 29G.

Ces tissus ont été infectés avec 250ng de P24 en présence de DEAE-dextran et maintenus en culture pendant 3 jours.

(C) l'hybridation *in situ* sur coupes du tissu "déplété" (en **B**) montre que l'accessibilité des particules virales au tissu autorise la transduction des cellules se trouvant dans les couches plus profondes du tissu.

A-B Photo *in toto* en lumière visible et en fluorescence (λ 499nm). C: photo HIS sur coupes fines 14 μ m.

Actuellement, ce protocole amélioré et standardisé permet à EndoCells, entreprise créée en 2004, de développer des lignées de cellules bêta pancréatiques murines et humaines que l'industrie pharmaceutique pourra utiliser pour tester à grande échelle ("criblage à haut débit") les effets de molécules d'intérêt. Cette entreprise est incubée conjointement au LGN (UMR7091-CNRS) et dans l'EMI 363 (INSERM).

4.2 Obtention de lignées stables de cellules β

Les motivations d'obtention de lignées β sont nombreuses. En effet dans le cadre d'études des cellules souches pancréatiques, ou dans la perspective de greffe de cellules β , l'une des difficultés majeures réside dans la faible quantité de tissu disponible. De nombreuses études se sont donc concentrées sur des approches permettant d'accroître la masse de cellules disponibles tels que l'utilisation de combinaisons de facteurs de croissance permettant de faire

proliférer en culture des cellules précurseurs à forte capacité de renouvellement puis d'induire leur différenciation en cellules à insuline. Il est également possible de réaliser des lignées stables de cellules endocrines en culture. La majorité des recherches menées dans ce domaine à l'heure actuelle se sont dirigées vers l'utilisation de vecteurs viraux pour transfecter des cellules épithéliales dans le pancréas. Les perspectives de nos travaux ouvrent des possibilités dans ce domaine par l'utilisation des propriétés de transduction des lentivirus sur des explants embryonnaires pancréatiques murins et humains.

Comme l'état précoce des tissus au moment où s'expriment les gènes d'immortalisation est une condition essentielle pour l'obtention de lignées endocrines murines stables, notre accès à des pancréas humains immatures permet d'envisager de transposer cette méthode à l'homme.

Ces résultats sont extrêmement encourageants et suggèrent qu'il serait possible de dériver des lignées humaines de cellules β immortalisées de façon conditionnelle par un protocole expérimental similaire.

4.3 Lignage cellulaire

Une autre application de cet outil est de pouvoir marquer *in vivo* par transfert de gène le réservoir des cellules souches du pancréas endocrine murin et humain. En effet, nous possédons différentes séquences promotrices autres que RIP, tels que des fragments du promoteur de *pdx1* capables de diriger l'expression d'un gène rapporteur dans des cellules progéniteur/souches pancréatiques.

Dans le but de tracer le lignage *ngn3*, nous avons construit un vecteur lentiviral assurant l'expression du gène rapporteur de la Green Fluorescent Protein (GFP) sous le contrôle de l'élément régulateur de 2,2 kb du promoteur du gène *Ngn3* (pTrip Δ U3.A1.7Pm β glob-eGFP) décrit dans la première partie des résultats. En effet, contrairement aux éléments déjà caractérisés par d'autres équipes (Lee *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2002; Jenny *et al.*, 2002), la taille de ce fragment est compatible avec la taille maximale insérable pour la construction d'un vecteur lentiviral efficace. De plus, cette "enhancer" *Ngn3* présente une très forte identité de séquence avec celle du promoteur *Ngn3* chez l'homme. Il est donc raisonnable de penser que, dans un contexte humain, cette séquence conserve ses propriétés de régulation.

Les perspectives proches consistent à utiliser d'autres séquences promotrices que nous avons testées en transgénèse. Actuellement cette construction (pTrip Δ U3.A1.7Pm β glob-eGFP) dans

un contexte lentiviral semble diriger l'expression du transgène rapporteur dans des épithéliums en culture (données préliminaires).

L'avantage de l'utilisation du rapporteur eGFP, outre la facilité de détection directe, permet d'avoir un accès aux outils puissants de tri cellulaire permettant de purifier ces cellules humaines marquées et d'utiliser les conditions de culture permettant le maintien et l'amplification de telles cellules.

Ces cellules permettront de générer les données expérimentales permettant de progresser de façon significative dans la compréhension de la biologie des cellules souches endocrines, dans la perspective de développer une thérapie cellulaire restauratrice pour le diabète de type I.

4.4 Restauration de la fonction NGN3

Enfin, un dernier point intéressant d'approfondir pour progresser dans la compréhension de la fonction de NGN3, est la restauration de la fonction NGN3 sur des ébauches pancréatique de souris *Ngn3*^{-/-} en culture. Cette approche permettrait d'observer les différences d'expression entre le transcriptome d'épithéliums *Ngn3*^{-/-} et celui d'épithéliums restaurés. Afin d'aborder ce point, nous avons construit plusieurs vecteurs viraux nous permettant de sur-exprimer le facteur de transcription NGN3 sous différentes conditions.

4.4.1 Culture organotypique de tissus de souris

Le modèle organotypique couramment utilisé dans le laboratoire de Raphaël Scharfmann est standardisé pour des épithéliums de rat E13 voire plus précoce E12 (communication personnelle Bertrand Duvillié). D'après l'expérience de ce dernier, la culture de tissus de souris est plus fragile mais néanmoins réalisable. Nous avons donc entrepris la culture d'ébauche de souris sauvage puis de souris invalidée pour *Ngn3*. La corrélation des stades embryonnaires en terme de développement du pancréas sont E13 rat = E11.5 souris (Slack, 1995). Les résultats de la mise en culture sont conformes **(i)** aux modèles de culture rat pour des ébauches de souris sauvage, et **(ii)** aux données de la littérature pour les épithéliums de souris *Ngn3*^{-/-} (à savoir une absence totale de développement endocrine sans altération de celui du tissu acinaire).

Cependant la culture du tissu de souris étant plus fragile car moins maîtrisée, les essais de vecteurs lentiviraux ont été effectués sur des ébauches de rat E13.

4.4.2 1^{ère} génération de vecteurs NGN3

La première génération de lentivirus produite exprimait NGN3 sous le contrôle du promoteur PGK (Phosphoglycerate kinase). Ce promoteur minimal très utilisé au laboratoire dans un contexte lentiviral permet une expression forte du transgène. De plus, la cinétique d'expression du transgène rapporteur eGFP de ce vecteur semble mimer l'expression endogène de NGN3 sur des cultures organotypiques, contrairement à celle d'un promoteur d'origine viral tel que CMV, comme représenté sur la figure ci-contre.

Nous avons donc substitué le gène rapporteur par la séquence codante de Relax, puis nous avons produit et testé ce nouveau vecteur sur des épithéliums de rat E13 déplétés en mésenchyme. Deux constatations ressortent de ces expériences : (1) le vecteur est fonctionnel puisque la surexpression de NGN3 a été constatée par *hybridation in situ* ; (2) cette surexpression entraîne un blocage du développement des cellules constituant l'ébauche car après 7 jours de culture, les tissus récupérés sont petits et non développés en tissu endocrine par rapport aux contrôles transduits.

Ces premiers résultats montrent la difficulté à utiliser ces vecteurs induisant une expression constitutive de NGN3 pour restaurer la fonction de NGN3 dans des épithéliums en culture.

4.4.3 Stratégie et 2^{ème} génération de vecteurs NGN3

Dans un premier temps, l'absence d'anticorps anti-NGN3 nous oblige à utiliser l'hybridation *in situ* comme moyen de détection de transduction, ce qui, d'une part, ne nous donne pas d'indication sur la présence de la protéine transduite et d'autre part empêche l'analyse de certains marqueurs dont l'immuno-marquage ne fonctionne pas après *in situ*. Pour y remédier, nous avons reconsidéré la séquence du transgène Relax en y ajoutant deux types d'étiquettes : c-myc (ajoutant en position N-terminale de Relax le peptide EQKLISEEDL) et HA (l'hémagglutinine d'influenza) (ajoutant en C-terminale de Relax le peptide YPYDVPDYA). Ces deux étiquettes sont reconnues comme épitope par des anticorps anti c-myc et HA respectivement. Tous ces vecteurs ont été produits, et sont actuellement en cours d'analyse sur épithéliums de rat E13 afin de vérifier l'innocuité de la protéine avec étiquette.

4.4.4 Modèles de surexpression

En parallèle nous avons testé plusieurs promoteurs différents dont les profils d'expression (cinétiques) sont schématisés sur la figure ci-dessous.

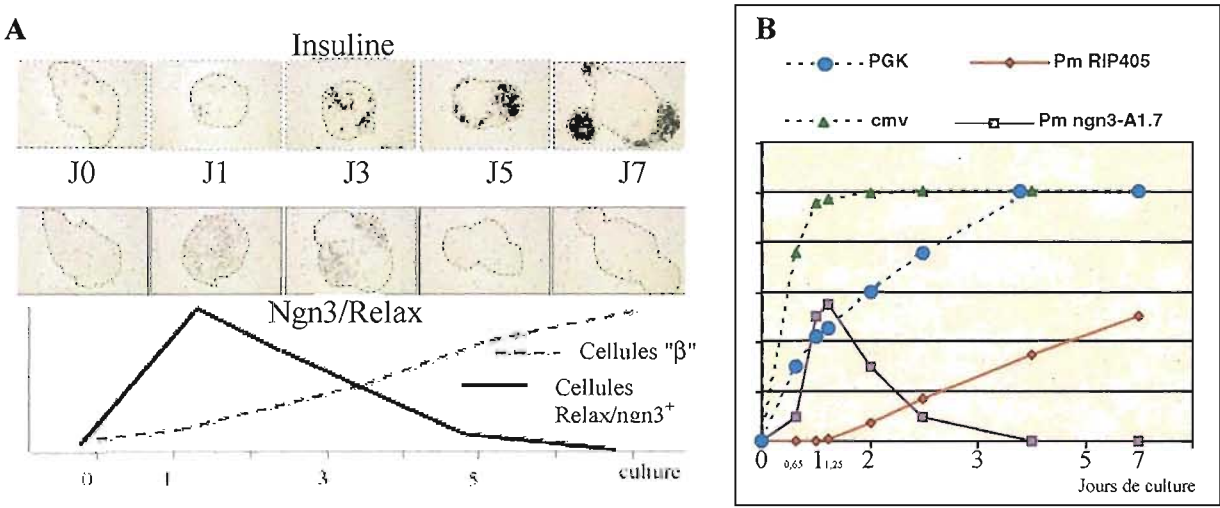


Figure 32 Comparaison des cinétiques d'expression en ARNm *Ngn3*/insuline et des différents promoteurs candidats.

- (A) Cinétique d'expression des ARNm *Relax* et *insuline* de culture d'épithéliums dorsaux de rat à E13 en matrice de collagène. D'après (Duvillie *et al.*, 2006).
- (B) Cinétique d'expression dans un contexte lentiviral de différents fragments de promoteurs ou enhanceurs. Nous recherchons un fragment de promoteur capable de mimer la cinétique d'expression de *Ngn3* endogène: soit de façon restreinte aux progéniteurs endocrines (constructions de transgénèse testées dans la 1^{ère} partie des résultats; soit plus ubiquitaire (*cmv* et *pgk*); soit pour adresser la synthèse de NGN3 dans d'autres types cellulaires. *RIP405* (insuline) nous sert de témoin.

L'objectif étant de sélectionner une construction capable de mimer l'expression endogène de *Ngn3* dans un modèle de culture organotypique (Duvillie *et al.*, 2006) afin de restaurer la fonction NGN3 *in vitro* sur des ébauches de mutants *Ngn3*^{-/-}.

Les résultats présentés ci-dessus ne sont que préliminaires mais, nous permettent d'élargir les perspectives de ce type d'approche. Enfin, la sélection de vecteurs de ciblage spécifiques des différentes sous-populations de cellules qui composent dans le temps le pancréas embryonnaire constitue une approche très intéressante. Ces vecteurs permettraient de réaliser des surexpressions ciblées afin de mieux comprendre l'implication de chacun des éléments de

la cascade moléculaire conduisant un progéniteur pancréatique vers sa différenciation terminale.

Une dernière approche intéressante serait d'utiliser deux technologies d'ARN interférence et de vecteurs conditionnelles (inductibles) très bien maîtrisées au laboratoire permettant une régulation de l'expression du transgène pour être le plus proche de la situation endogène étudiée.

RESULTATS 3

RESULTAT 3 - ETUDE DE LA FONCTION NEURALE DE NGN3

HYPOTHESE DE TRAVAIL : NGN3 UN GENE PRONEURAL

Avant d'exposer des résultats obtenus sur la fonction de détermination neuronale de NGN3; nous allons replacer le faisceau d'arguments dont nous disposions au commencement de ce projet, pour échafauder notre hypothèse de travail. Puis dans un second temps, nous exposerons tous les faits nouveaux sur lesquels nous nous sommes appuyés pour l'étoffer.

- Tout d'abord **son patron d'expression**

L'expression transitoire de *Ngn3*, telle que nous l'avons décrite dans l'introduction se trouve à l'intersection entre:

- (i) Une expression restreinte aux cellules contenues dans le neuroépithélium, territoire neurogénique dans lequel des cellules ectodermes "naïves" vont acquérir une compétence pour devenir des précurseurs neuraux, puis vont s'engager dans les voies qui conduisent vers la différenciation neuronale en migrant à l'extérieur de ce territoire (**Figure 33 A**).
- (ii) Une fenêtre d'expression temporelle coïncidant avec les étapes où se déroule une neurogenèse active. Cette situation est à rapprocher de l'étude du patron endocrine de *Ngn3* dont la fenêtre d'expression transitoire concorde parfaitement avec l'induction de l'engagement des progéniteurs pancréatiques vers la voie endocrine (d'où le terme transposé de facteur proendocrine).
- (iii) Son appartenance à une **famille de facteurs à fonction proneurale** chez les vertébrés

Chez les vertébrés, les trois neurogénines sont décrites comme exprimées dans des territoires neurogéniques (Gradwohl *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1996; Sommer *et al.*, 1996b; Cau *et al.*, 1997; Lee, 1997; Ravassard *et al.*, 1997b).

L'étude des différents modèles murins invalidés pour *Ngn1* et *Ngn2* ont permis de déterminer que contrairement à leur homologue drosophilien, ils étaient clairement dotés d'une réelle fonction proneurale pour certaines sous-populations neuronales (Fode *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 1999; Scardigli *et al.*, 2001; Bertrand *et al.*, 2002).

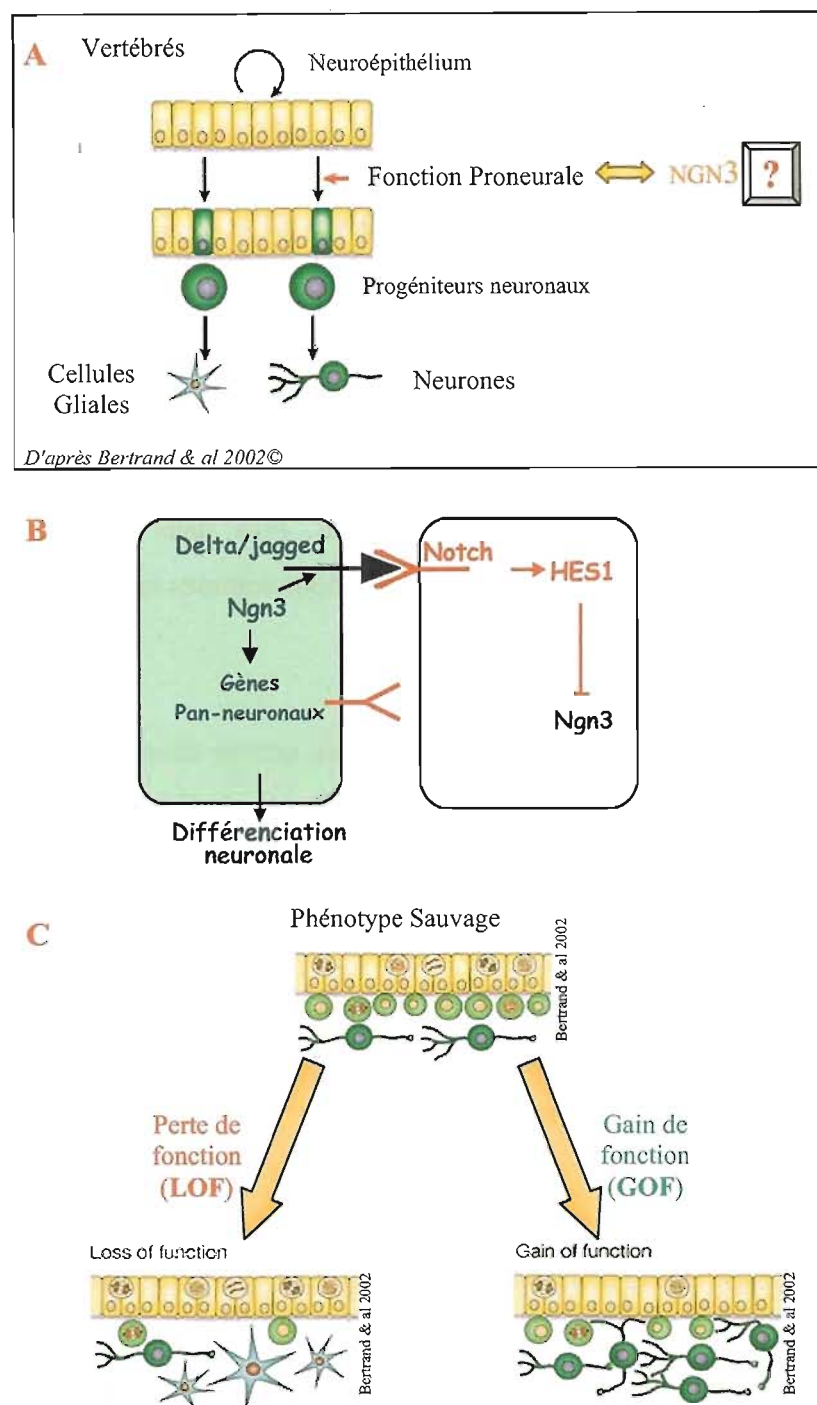


Figure 33 Résumé de l'hypothèse de travail: neurogénine 3 un facteur proneural

(A) Chez les vertébrés, un gène proneural est exprimé dans des cellules neuroépithéliales déjà engagées dans la voie neuronale. une cellule déjà destinée La fonction proneurale est requise pour la sélection des progéniteurs neuronaux (dont le pouvoir mitotique est réduit) et leur engagement dans une voie de différenciation conduisant par exemple à la formation d'une cellule gliale ou d'un neurone.

Cette fonction est couplée avec le processus d'inhibition latérale (voie de signalisation de Notch). Ainsi une cellule s'engageant dans la voie de différenciation neuronale inhibe ses voisines de suivre cette même voie. Ainsi, la mutation d'un gène proneural devrait perturber la voie d'inhibition latérale (B)

(C) Afin de tester la fonction proneurale de ngn3: deux stratégies complémentaires permettent d'approcher la fonction de ce gène au cours du développement embryonnaire par perte et gain de fonction ce que nous nous proposons de vérifier ici.

Les travaux concernant l'analyse de la fonction des gènes *Ngn1*, *Ngn2* et *Mash1* ont montré que la mutation nulle d'un gène de détermination provoque la perte d'expression des gènes codant les ligands de NOTCH (DELTA1, JAGGED1) et les protéines impliquées dans la voie de signalisation de Notch (comme HES1 et HES5). Ces marqueurs seront utilisés sur le mutant *ngn3* afin de mettre en évidence les mêmes perturbations de la voie d'inhibition latérale provoquées par l'invalidation d'un gène proneural (**Figure 33 B**).

- Les résultats de la première **étude de gain de fonction: Hyperplasie neurale (Figure 33 C)**.

Les conséquences d'une surexpression de *Relax/Ngn3* au cours du développement embryonnaire ont été examinées. Le modèle anoure constitue un des modèles de choix pour des expériences de gain de fonction (GOF). En effet, les œufs de Xénope de par leur taille sont facilement injectables et leur développement peut être directement observé. De plus, le premier clivage (passage une cellule à deux cellules) détermine la polarité gauche droite de l'embryon. Ainsi l'injection d'ARN à surexprimer se fait de façon unilatérale. Les deux blastomères gauches sont injectés avec une solution contenant les ARN tandis que le second côté servira de contrôle subissant, soit le même traitement d'injection de la même solution sans ajout d'ARN, soit servant de témoin de développement. Une fois injectés, les embryons poursuivent leur développement et sont maintenus jusqu'au stade neurula. A ce stade un différentiel phénotypique est observé au niveau de la plaque neurale. En effet, le gain de fonction RELAX/NGN3 provoque un élargissement de la plaque neurale. De plus la surexpression de *Relax/Ngn3* chez l'embryon de Xénope induit une hyperplasie neuronale ce qui suggère qu'il est capable d'induire la conversion de cellules de l'épiderme en neurones.

Ainsi, l'analyse combinée des expériences de surexpression et de distribution spatio-temporelle de *Relax/Ngn3* suggère fortement une fonction de détermination neuronale pour RELAX/NGN3 (Ravassard *et al.*, 1997d). Il était donc important de confirmer par une approche par perte de fonction (LOF) que NGN3 est un facteur de détermination neuronal.

MATERIEL ET METHODES

1 Obtention des lignées de mutants nuls

- ❖ Les **lignées Ngn3^{+/-}** que nous avons utilisées au laboratoire ont été générées par Philippe Ravassard au cours de son stage post-doctoral dans le laboratoire dirigé par Jean-Pierre Julien à l'université Mc GILL de Montréal. Cette lignée, depuis son rapatriement dans notre animalerie, est maintenue sur fond génétique C57bl6 par "back cross".
- ❖ La **lignée Mash1^{+/-}** stabulée au laboratoire a été obtenue auprès de François Guillemot (IGBMC, Illkirch) (Guillemot *et al.*, 1993).
- ❖ La **lignée Mash1/Ngn3** a été obtenue par sélection sur des accouplements entre souris Mash1^{+/-} et Ngn3^{+/-} permettant d'obtenir la configuration des deux allèles mutés sur le même chromosome. Le fondateur issu de cette sélection ainsi que tous les animaux programmés pour l'obtention des embryons double-mutés sont testés au préalable par accouplement sur animaux sauvages pour s'assurer de la bonne transmission de la mutation sous forme biallélique.

2 Obtention des embryons

Tous les embryons ont été obtenus par accouplements contrôlés, en considérant le matin de vérification de la présence du bouchon vaginal ("plug") comme le stade embryonnaire E0.5. Aux différents stades attendus, les femelles gestantes sont sacrifiées par dislocation cervicale et les embryons sont prélevés des cornes utérines dans leurs sacs embryonnaires et rincés dans une solution de PBS1x. Les annexes embryonnaires seront utilisées pour déterminer le génotype de chacun des embryons comme décrit dans le matériel et méthode de la première partie des résultats.

Remarque: Le nombre de génotypages nécessaires à ce projet étant très important nous avons apporté des modifications à ces protocoles afin d'utiliser directement la solution d'ADNg après digestion par la protéinase K pour la réaction de PCR. (Résultat 1/§4.2).

3 Génomotypages

Le génotypage des tous les animaux et embryons est obtenu par PCR, avec des amorces spécifiques pour chaque construction. Les séquences oligonucléotides sont indiquées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 14**); leurs positions sont indiquées sur le schéma représenté juste en dessous. Le génotypage des animaux double-mutants a nécessité la mise au point d'amplifications spécifiques sans l'utilisation des oligonucléotides classiques néo 1 et 2 du fait de la présence de la même cassette de sélection dans les deux constructions transgéniques.

Amorces	Séquences	Amplicons		Détermine la présence de l'allèle	
Jm1	TACCAACTGGTTCTGAGGACCC	468pb		Mash1 sauvage	
Jm3	CCCATTGACGTAGTTGG				
Tw70	CCAGGACTCAATACGCAGGG	625pb		Mash1 muté	
Néo4	GCAGCGCATCGCCTTCTATC				
Neo1	5'-GATCTCCTGTCATCTCACCT-3'	270pb		Mash1 muté	
Néo2	5'-ATGGGTCACGACGAGATCCT-3'			Ngn 3 muté	
NLS	GTCTTGGGGTCTTCTA	450pb		Ngn 3 muté	Ngn 3 sauvage
5'UTR	5'-TCTGGGTCTCATCACTG-3'				
NgnAS	5'-AGGTTGTGCATGCGGTTGCGCTC-3'		651pb		

Tableau 14 Récapitulatif des amorces utilisées lors des PCR de génotypage des animaux et embryons Ngn3; Mash1 et double-mutants.

4 HIS

Les hybridations *in situ* (HIS) on été effectuées de façon identique à ce qui est décrit dans les publications du laboratoire. La provenance et la taille des différentes sondes présentées dans cette partie de résultats sont indiquées ci-dessous:

- ❖ Mash-1 : antisens XbaI, sonde SP6 taille 1,2 kb (don de F. Guillemot)
- ❖ Sim-1 : antisens EcoRI, sonde T7 taille 1,2 kb (don de G. Weinmaster)
- ❖ Nkx2.2 : antisens NotI, sonde T7 taille 2,1 kb (don de J.L. Rubenstein)
- ❖ Dll1 : antisens EcoRI, sonde T7 taille 1,3 kb (don de G. Weinmaster)
- ❖ Jagged1 : antisens XhoI, sonde T3 taille 0,65 kb (don de G. Weinmaster)

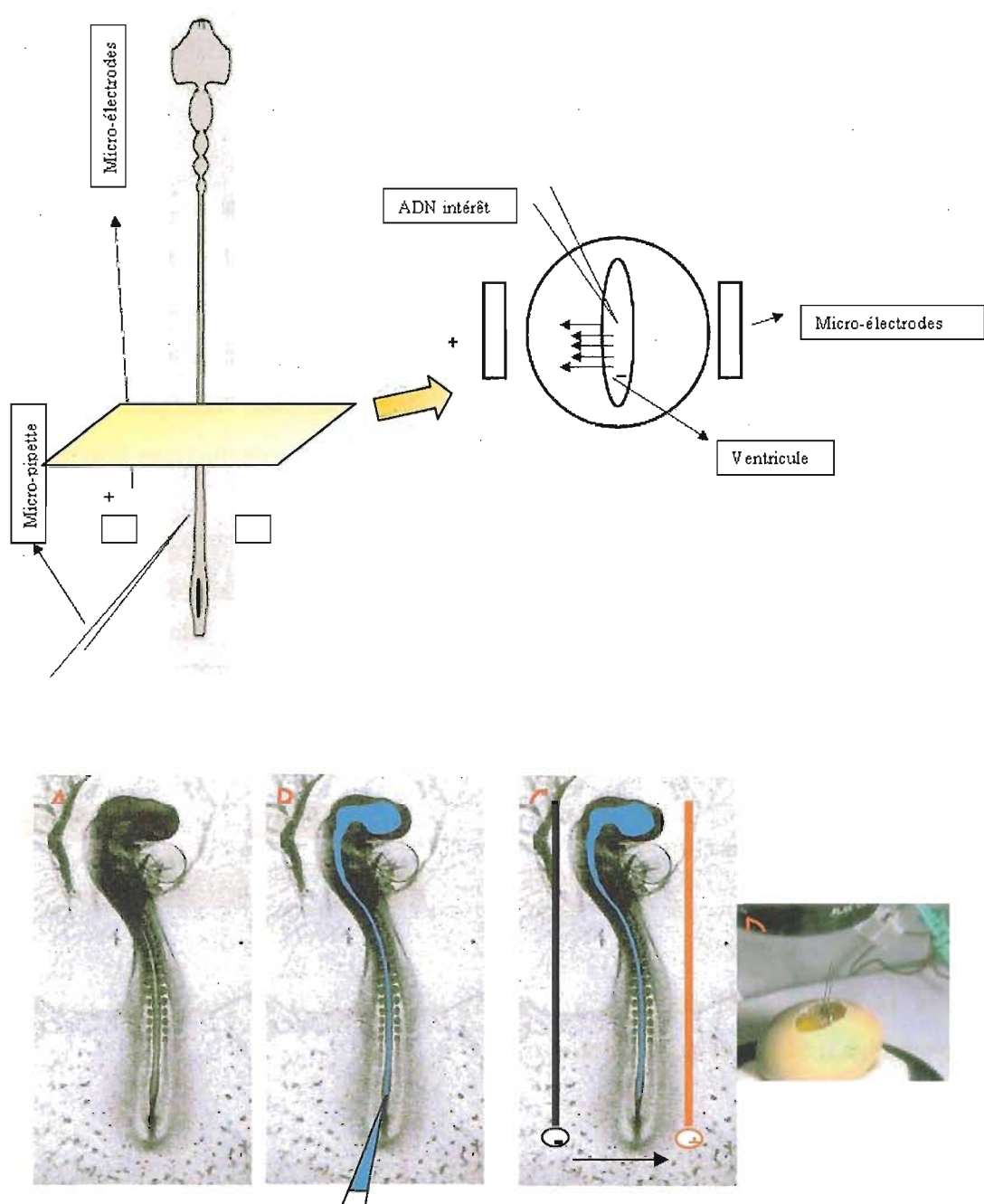


Figure 34 Principe de l'électroporation chez l'embryon de poulet

- ❖ HES5 : antisens HindIII, sonde T3 taille 1,3 kb (don de F. Guillemot)
- ❖ VgluT2 : antisens NotI, sonde SP6 taille 0,54 kb (don de S. El Mestikawi)
- ❖ VgluT3 : antisens NotI, sonde SP6 taille 0,41 kb (don de S. El Mestikawi)
- ❖ NeuroD : antisens SacII, sonde SP6 taille 0,8 kb (don de P. Ravassard)

5 Injection de Dye-I

La micro-injection du fluorochrome Dye-I, dans les ganglions sensoriels permet de visualiser l'ensemble des projections neuronales de la moelle épinière sensoriels sur des coupes épaisses de 300 μ m d'embryons E13.5. Le Dye-I, totalement liposoluble diffus de façon passive à l'intérieur des membranes plasmiques.

Le colorant est injecté à l'aide d'une micropipette ($\varnothing$ 0,5 μ m) et d'un micro-injecteur. Les coupes épaisses sont maintenues en solution de PBS1X-paraformaldéhyde à 4% (PFA) et mises à l'étuve à 37°C et à l'abri de la lumière pendant 10 jours afin de laisser le colorant diffuser. La visualisation de la fluorescence émise en rouge, après montage des coupes (Ultramount DAKO) se fait par microscopie à fluorescence.

6 Electroporation *in ovo* (dans le tube neural chez le poulet)

Les embryons de poulet électroporés (voir **Figure 34**) sont au stade de 18 somites soit environ 24 heures d'incubation. L'œuf est positionné sur le côté, 2 ml de blanc d'œuf sont prélevés afin d'abaisser le niveau de l'embryon par rapport au haut de la coquille et une fenêtre d'ouverture sur le dessus de celle-ci est pratiquée permettant d'accéder directement à l'embryon. Afin de mieux distinguer l'embryon et donc de repérer le site d'injection, de l'encre de chine (diluée au 1/10 en PBS) est injectée sous l'embryon.

La construction d'ADN à injecter est composée d'un promoteur composite fort ("enhancer" adénoviral précédant le promoteur minimal viral RSV), qui permet une expression rapide de NGN3 (RELAX). Afin de suivre facilement l'expression de cette cassette, une séquence IRES-GFP est présente à la suite de la séquence codante de *Ngn3*. Débarrassé de ces impuretés par centrifugation, cet ADN est injecté dilué dans une solution de PBS et de

colorant vert inerte, ce qui permet de visualiser la diffusion de la solution injectée le long du tube neural (environ un nanolitre). L'ADN est électroporé d'un seul côté de la moelle épinière par un choc électrique, appliqué en positionnant les électrodes (Longueur : 1 mm / espacement entre elles: 0.5 mm) de part et d'autre de l'embryon après avoir ajouté quelques gouttes de PBS. Le générateur délivre 6 impulsions électriques de 50 ms et de 23 volts chacun. Après électroporation l'ADN sera intégré dans les cellules périphériques bordant le neuroépithélium d'un seul côté de l'embryon; l'autre servira de contrôle direct de l'expérience.

Avant de remettre en incubation, on dispose un scotch spécifique sur l'ouverture pratiquée afin que l'embryon ne sèche pas durant la nuit.

On récupère les embryons viables après 24 heures d'incubation. La réussite de l'électroporation est, dans notre cas, directement visualisable sous loupe à fluorescence puisque que le gène rapporteur utilisé exprime la protéine GFP au niveau de la moelle épinière. Sachant que celle-ci est précédée de la protéine NGN3, on peut donc supposer que dans ces embryons il y aura surexpression de NGN3. Les embryons retenus comme positifs sont fixés en paraformaldéhyde 4% pendant environ 2 heures à 4°C, puis cryoprotégés dans une solution de sucre 15%, inclus et congelés pour être coupés au cryostat en section de 14µm.

NOUVELLE APPROCHE POUR APPREHENDER LA FONCTION DE NGN3 : UN, PUIS DEUX, PUIS TROIS MODELES DE PERTE DE FONCTION

Pour aller plus loin dans la caractérisation de la fonction de NGN3, un modèle de souris invalidé pour le gène *Ngn3* (*ngn3* KO) a été généré au laboratoire. La lignée *ngn3* KO obtenue au laboratoire présente le même phénotype létal que celle produite par G. Gradwohl (Gradwohl *et al.*, 2000). Le phénotype pancréatique des souris portant la mutation nulle *Ngn3* est sans aucun doute spectaculaire, néanmoins ce résultat n'exclut pas un effet important de la mutation sur le développement du système nerveux (ce que nous avons cherché à mettre en évidence).

- 1 Construction du vecteur de ciblage; recombinaison homologue et production des lignées *Ngn3*^{-/-}

Les séquences génomiques ont été obtenues par criblage de la même banque génomique utilisée pour isoler les régions régulatrices de *Ngn3* que nous avons utilisés en transgénèse (voir introduction § 2.2.2 et **Résultat1**). La sonde utilisée est une sonde hétérologue de 800pb contenant la totalité de la séquence codante de Relax (séquence rat). Il en ressort la carte de restriction du locus du gène murin neurog3 représenté sur la **Figure 35**, ci-contre.

Le vecteur de ciblage généré pour la recombinaison homologue, généré contient près de 10kb du locus *Ngn3* dans lequel la séquence codante de *Ngn3* a été substituée par celle du gène rapporteur *LacZ* (codant la β -galactosidase) disposant d'un signal de localisation nucléaire (NLS). Cette stratégie de knock in (KI) permet l'expression nucléaire du gène *LacZ* à la place du gène *Ngn3* endogène. Ce vecteur contient à la suite du gène *LacZ* une cassette sélection néomycine qui permettra de sélectionner, à l'aide du G418, les clones ES-R1 électroporés ayant intégré la cassette de ciblage (Nagy *et al.*, 1993).

L'analyse par southern blot des ADN génomiques des clones résistants à la néomycine permet de vérifier les événements de recombinaison homologue comme illustré sur l'encart B de la **Figure 35**.

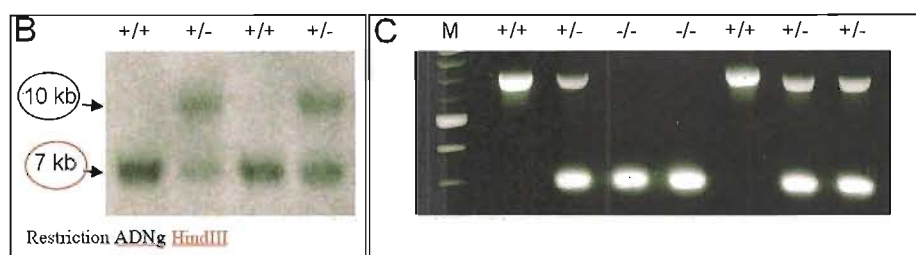
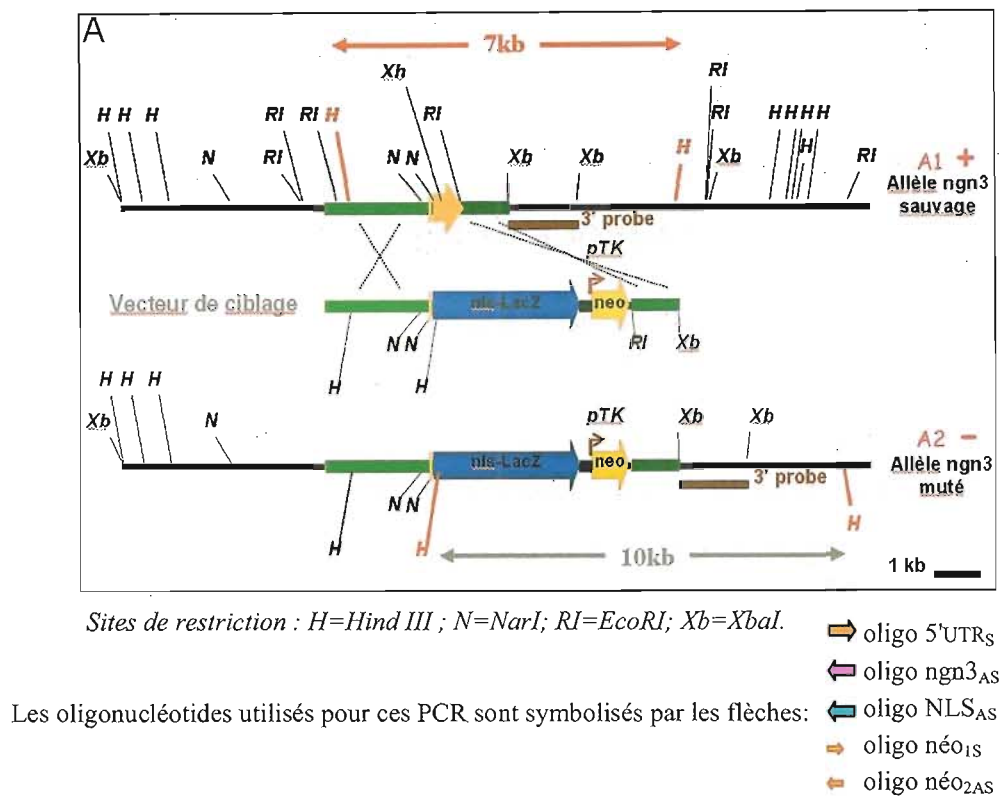


Figure 35 Représentation schématique de la cassettes de recombinaison homologue KI Δ ngn3:NLS-LacZ et détection du bon évènement de recombinaison

- A-** Cette partie de figure est une représentation graphique de la stratégie moléculaire de l'obtention du mutant nul pour le gène *ngn3*. En vert sont représentés les "bras longs et courts" permettant la recombinaison homologue. Il s'agit des séquences flanquantes positionnées de part et d'autre de la séquence codante flèche saumon. Ce vecteur permet de substituer la séquence codant la protéine *ngn3* par celle du gène rapporteur LacZ en amont du gène de sélection Néo. La recombinaison homologue est effective dans les cellules ES auxquelles le vecteur de ciblage a été apporté par électroporation. Ainsi, les clones ayant intégrés le bon évènement de recombinaison posséderont une copie mutée représenté par le schéma A2 et seront néomycine^R ; en revanche les clones non recombinés (schéma A1) seront néomycine^S et ne seront pas sélectionnés en présence de G418.

Ces cartes ont été générées via l'application vecteur NTI.

- B-** Ce cadre représente le résultat de la détection (Southern blot) des évènements de recombinaison ou non dans les clones ES. Les taille des fragments attendus après restriction de l'ADNg par HindIII sont indiqués sur la figure A; soit 7kb (rouge) dans le cas de l'allèle sauvage et 10kb dans ce lui de l'allèle muté (recombiné).
- C-** Afin de déterminer parmi les premiers animaux chimériques, lesquels transmettent la mutation à leur descendance, une PCR de génotypage est mise au point. Donc en théorie une souris homozygote sauvage possèdera deux copies génomiques identiques au schéma A1 (+) ou muté deux copies identiques au schéma A2 (-); et enfin des animaux hétérozygotes seront pourvus d'une copie de chaque (A1/A2) +/-.

Les clones ES ainsi sélectionnés sont injectés dans des blastocystes de souris C57bl6 qui donneront les premières souris transgéniques "chimères". Celles devront être testées pour leur capacité à transmettre à leurs descendants le transgène. Deux lignées indépendantes ont ainsi été établies.

Le génotype des différents animaux est déterminé par PCR sur ADN génomique. L'encart C de la figure précédente montre un résultat représentatif de génotypage d'une portée d'embryons issus d'un croisement entre parents hétérozygotes.

2 Phénotype des embryons et des nouveaux nés $Ngn3^{-/-}$

Le phénotype léthal de la mutation *ngn3* à l'état homozygote observé chez les nouveaux nés ne permet pas d'établir de lignées homozygotes mutantes. De fait, les études phénotypiques ainsi que le maintien des lignées doivent être réalisés à partir d'accouplement entre parents hétérozygotes.

2.1 Effet de la mutation sur la taille et le *sexe ratio*

La simple observation des embryons prélevés entre 9,5 et 18,5 jours de développement ne permet pas de reconnaître les mutants homozygotes des autres embryons. Toutefois, à la naissance les nouveaux $Ngn3^{-/-}$ sont systématiquement plus petits en taille.

La mutation affecte le sexe-ratio des animaux générés. En effet, dans notre animalerie, ce ratio pour des portées sauvages est en moyenne de 12% en faveur des femelles. Dans le cas des souris *ngn3* ce même ratio est observé pour les animaux sauvages issus des accouplements inter-hétérozygotes. En revanche la population des animaux $Ngn3^{+/-}$ ne suit pas cette même distribution puisque la valeur moyenne s'élève à 23% de la population, soit deux fois la valeur moyenne de l'animalerie. Un autre point à noter concerne la fertilité de ces animaux: il nous a semblé que nous avions de plus en plus de difficultés à obtenir des accouplement efficaces et donc des femelles gestantes (quelque soit le fond génétique des animaux consanguin C57bl6 ou non CD1). Ces observations demanderaient à être approfondies à la lumière de l'implication de NGN3 dans les premiers stades de la spermatogenèse. De plus, la différence entre la proportion de mâles et de femelles observée ne

résulte pas d'une létalité embryonnaire puisque les proportions Mendéliennes des trois génotypes sont parfaitement respectées.

2.2 Effet de la mutation et développement du pancréas

Les travaux princeps effectués par G. Gradwohl sur le mutant *Ngn3* ont permis de démontrer que le gène *Ngn3* joue un rôle primordial dans la différenciation des quatre types cellulaires composant le pancréas endocrine. Il s'agit en fait du premier gène identifié contrôlant le développement de la totalité des cellules endocrines du pancréas (Gradwohl *et al.*, 2000). Les résultats de nos analyses dans le pancréas du mutant *Ngn3* généré au laboratoire sont entièrement concordants avec ceux obtenus par G. Gradwohl. Toutefois, nous avons observé une létalité des nouveaux nés *Ngn3*^{-/-}, sur le fond génétique C57bl6, dans les heures qui suivent leur naissance. Cette létalité est plus précoce que celle décrite dans la première étude (Gradwohl *et al.*, 2000).

Le dosage de la glycémie des souriceaux permet de reconnaître les génotypes des mutants homozygotes. La valeur obtenue pour ces derniers est trois fois supérieure à celle mesurée chez les sauvages (ou les hétérozygotes). Toutefois ce critère ne permet pas de faire le distinguo entre hétérozygotes et homozygotes sauvages qui possèdent les mêmes taux de glucose sanguin et répondent de façon similaire à une hyperglycémie provoquée (observation chez l'adulte non publiée).

Enfin, nous avons effectué une observation importante au stade embryonnaire E12,5 sur des cultures organotypiques des pancréas embryonnaires de portées de souris *ngn3* KO. Il s'avère que dans des conditions de déplétion du mésenchyme, nous avons observé des différences morphologiques des épithéliums pancréatiques qui ont été systématiquement confirmées par la PCR de génotypage. En effet, les épithélia des embryons *Ngn3*^{-/-} présentent une structure différente du centre du bourgeon dorsal (données personnelles, observées par Yasmine Hazhouz).

Le phénotype pancréatique des souriceaux portant la mutation nulle *ngn3* est sans conteste le plus impressionnant. L'invalidation du gène *ngn3* peut aussi avoir d'autres conséquences notamment au niveau du SNC puisqu'il est exprimé dans la moelle épinière et dans l'hypothalamus. Cependant, contrairement à la situation pancréatique, où le devenir des

cellules exprimant NGN3 est connu, nous ne connaissons pas le devenir des cellules qui expriment NGN3 dans le SNC.

Nous nous sommes concentrés sur l'étude du phénotype des mutants *ngn3* dans le tube neural médullaire qui est à l'origine de la moelle épinière. Nous avons sélectionné ce territoire pour la relative simplicité de son architecture et les nombreuses données existantes sur son développement. (Tanabe et Jessell, 1996; Lee et Jessell, 1999; Jessell, 2000; Altmann et Brivanlou, 2001; Poh *et al.*, 2002).

Avant de détailler le phénotype du mutant nul, il est important d'expliquer l'organisation moléculaire de la moelle épinière et de replacer les territoires d'expression de *Ngn3* dans cette cartographie.

3 *Ngn3* et tube neural postérieur

La localisation particulière des territoires d'expressions des ARNm *Ngn3* dans le tube neural ventral suggère que son expression est fortement dépendante des gradients de morphogènes existant entre les deux extrémités ventrale et dorsale du tube neural. Pour comprendre la mise en place des territoires *Ngn3*, nous rappellerons la cartographie moléculaire mise en place par ces gradients de morphogènes dans la région ventrale de la moelle épinière en nous limitant au territoire localisé le plus ventralement (appelée bande v). Pour cela, la **Figure 36** résume cette cartographie.

Initialement, il existe cinq domaines distincts de progéniteurs neuronaux dans le neuroépithélium ventral appelés p3, pMN, p2, p1 et p0, de la région la plus ventrale à la plus dorsale. Il est clairement établi que cette régionalisation est placée sous la dépendance d'un gradient de Sonic Hedgehog (SHH), protéine sécrétée par les tissus axiaux (notochorde et plaque du plancher). Dans la région ventrale du tube neural, un gradient de concentration de SHH est converti en domaines d'expression de facteurs de transcription à homéodomaine de deux classes (I et II). Les interactions répressives entre ces facteurs de classe I et de classe II délimitent des domaines dont les frontières sont bien définies selon l'axe dorso-ventral. Ainsi,

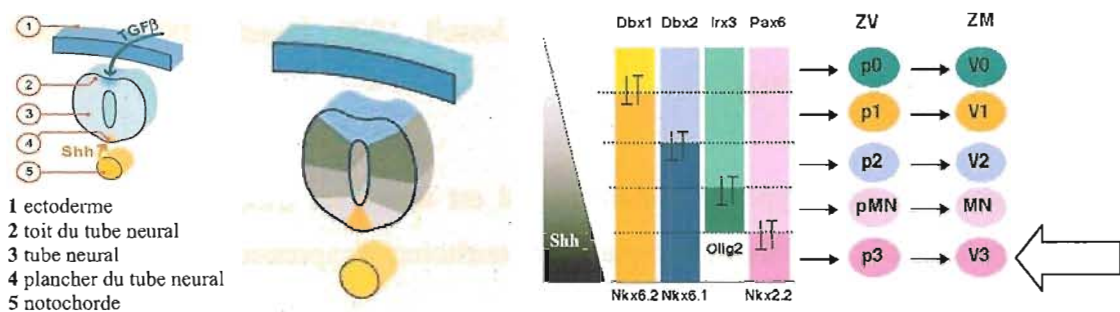


Figure 36 Modèle de spécification des populations neuronales ventrales dans la moelle épinière

Régionalisation dorso-ventrale induite par le gradient morphogénique de shh.

Le gradient de concentration de SHH, induit la délimitation de 5 domaines de progéniteurs dans la zone ventriculaire (ZV) ventral de la moelle épinière (p3, pMN, p2, p1 et p0). Chaque domaine exprime une combinaison de gènes qui lui sont propres, ce qui localisera les différents types cellulaires produits (interneurones V3, V2, V1, V0 et motoneurones MN). Une fois spécifiés les progéniteurs sortent du cycle cellulaire et migrent vers la zone marginale (ZM) où ils poursuivent leur différenciation.

La flèche blanche indique le territoire ventral dans lequel ngn3 est exprimé à cet endroit du tube neural.

Modèle proposé et adapté d'après Jessell 2000.

ces différentes répressions transforment un gradient continu de morphogène en domaines discrets de progéniteurs neuronaux. La combinaison de facteurs de transcription à une position donnée de l'axe dorso-ventral (code génétique) définit une classe de progéniteurs neuronaux particulière (Briscoe *et al.*, 2000; Jessell, 2000). Par translation les cinq classes de progéniteurs ventraux donnent naissance aux motoneurones (MN) et aux interneurones V3, V2, V1 et V0. (Briscoe *et al.*, 1999; Briscoe *et al.*, 2000; Jessell, 2000; Poh *et al.*, 2002). La région décrite comme capable de produire des motoneurones MN (les autres domaines étant décrits comme réfractaires) est positionnée entre les régions p3 et p2 productrices d'interneurones.

Les précurseurs exprimant les ARNm *Ngn3* sont localisés dans le territoire le plus ventral de la zone ventriculaire, juste au-dessus de la plaque du plancher et au-dessous du domaine à l'origine des motoneurones. Ce territoire est exclusivement contenu dans la zone exprimant le gène à homéoboîte *Nkx2.2* impliqué dans la formation des interneurones V3. (pour revue voir Jessell, 2000; (Briscoe *et al.*, 1999))(voir **Figure 37**).

Toutefois, la localisation et la caractérisation de ces interneurones V3 chez l'adulte n'ont jamais été effectuées et aucun marqueur spécifique de cette population de cellules n'est connu. Le seul marqueur embryonnaire connu est le gène *Sim-1* dont l'expression est restreinte à un petit groupe de cellules localisé dans la zone du manteau à une position adjacente du domaine *Nkx2.2* / *ngn3* indiquant qu'il s'agit d'intermédiaire de différenciation des interneurones V3. De plus, l'analyse du mutant perte de fonction *Nkx2.2* a clairement montré que les interneurones V3 exprimant *Sim-1* se différencient à partir des progéniteurs *NKX2.2*⁺. Ainsi la position de *NGN3* dans la cascade de différenciation des interneurones V3 a été définie en aval de *NKX2.2* et en amont de *SIM-1* (Briscoe *et al.*, 1999).

4 L'invalidation de *Ngn3* modifie-t-elle cette cartographie?

L'hypothèse fonctionnelle pour *NGN3* que nous avons formulée positionne ce gène comme gène de détermination neuronale. Ainsi dans la moelle épinière nous avons recherché si la mutation nulle *ngn3* perturbe (i) le maintien de l'information de position dans le tube nerveux

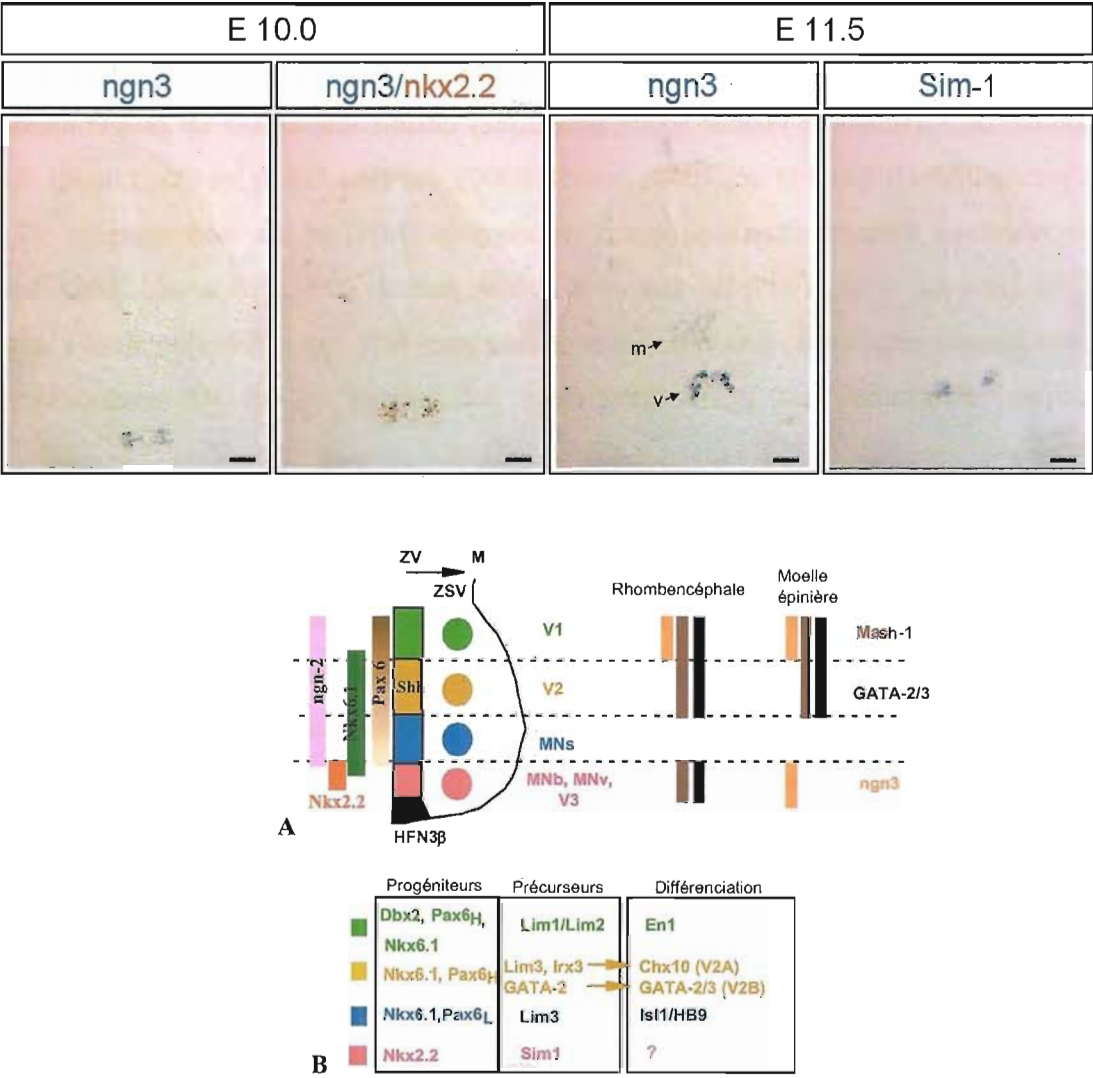


Figure 37 Le domaine d'expression ventral de ngn3 est compris dans les territoires exprimant NKX2.2 et Sim1

E10 : Le territoire d'expression de ngn3 (en bleu) est localisé dans le neuroépithélium dans la région la plus ventrale (domaine V3) dès le stade embryonnaire E10 (bande v). Ce territoire est contenu exclusivement dans le territoire d'expression de nkx2.2 (marquage en rouge).

E11.5 : Le second territoire de ngn3 plus médian est visualisable (bande m). A ce stade, le marquage du territoire ventral précoce forme deux bandes très distinctes. L'intermédiaire de différenciation Sim1 est observé dans la même zone du domaine V3.

Marquage obtenu par simple et double hybridation in situ sur coupes fine (14µm). Barre 50 µm.

; (ii) le processus de l'inhibition latérale ; (iii) la spécification neuronale. Ces études ont été réalisées en comparant les profils d'expression des différents marqueurs caractéristiques de ces trois paramètres, chez les embryons *Ngn3*^{-/-} et ^{+/+}, par hybridation *in situ*. Nous avons été confrontés à l'impossibilité de détecter de façon claire le produit du gène *LacZ* inséré dans le locus du gène *Ngn3* chez les embryons homozygotes pour la mutation.

L'activité β -Galactosidase n'est pas détectable par coloration x-gal. Le marquage par immunohistochimie n'est visible que précocement dans le tube neural des mutants *Ngn3*^{-/-} (E 10.5 à 12.5; jamais ultérieurement) au niveau de la bande la plus ventrale et extrêmement faible dans la zone médiane. Les marquages ne sont pas visibles chez les embryons *Ngn3*^{+/-} aux mêmes stades.

❖ Effet de la mutation *ngn3* sur l'information de position dans la moelle épinière

Comme nous l'avons mentionné juste avant, les progéniteurs de la moelle épinière qui expriment les ARNm de *Ngn3* sont entièrement localisés à l'intérieur du domaine d'expression de *Nkx2.2*⁺ et co-expriment *Nkx 6.1*⁺ et *Nkx 6.2*⁺ (Sommer *et al.*, 1996b; Cau *et al.*, 1997; Ravassard *et al.*, 1997d; Lee *et al.*, 2003) (voir **Figure 38**). Chez les embryons *Ngn3*^{-/-} on n'observe aucune altération de l'expression de ces gènes de position et en particulier pour *Nkx2.2*.

Ainsi, l'invalidation du gène *Ngn3* ne semble pas interférer avec la définition des limites d'expression des marqueurs de position bordant les domaines p3 et pMN. Il ne semble pas modifier l'équilibre entre les gènes homéotiques de classes I et II.

❖ Effet de la mutation *ngn3* sur le processus d'inhibition latérale

En tant que gène proneural, *Ngn3* devrait participer au phénomène d'inhibition latérale. Les résultats des expériences de marquages des territoires d'expression des gènes ligands (DELTA1 et JAGGED1), ou du récepteur NOTCH ou enfin des effecteurs tel que HES1 sont représentés sur la Figure 38. Il s'avère que la mutation de *ngn3* entraîne aucune altération de la voie Notch. Ce résultat va à l'encontre de notre hypothèse de départ.

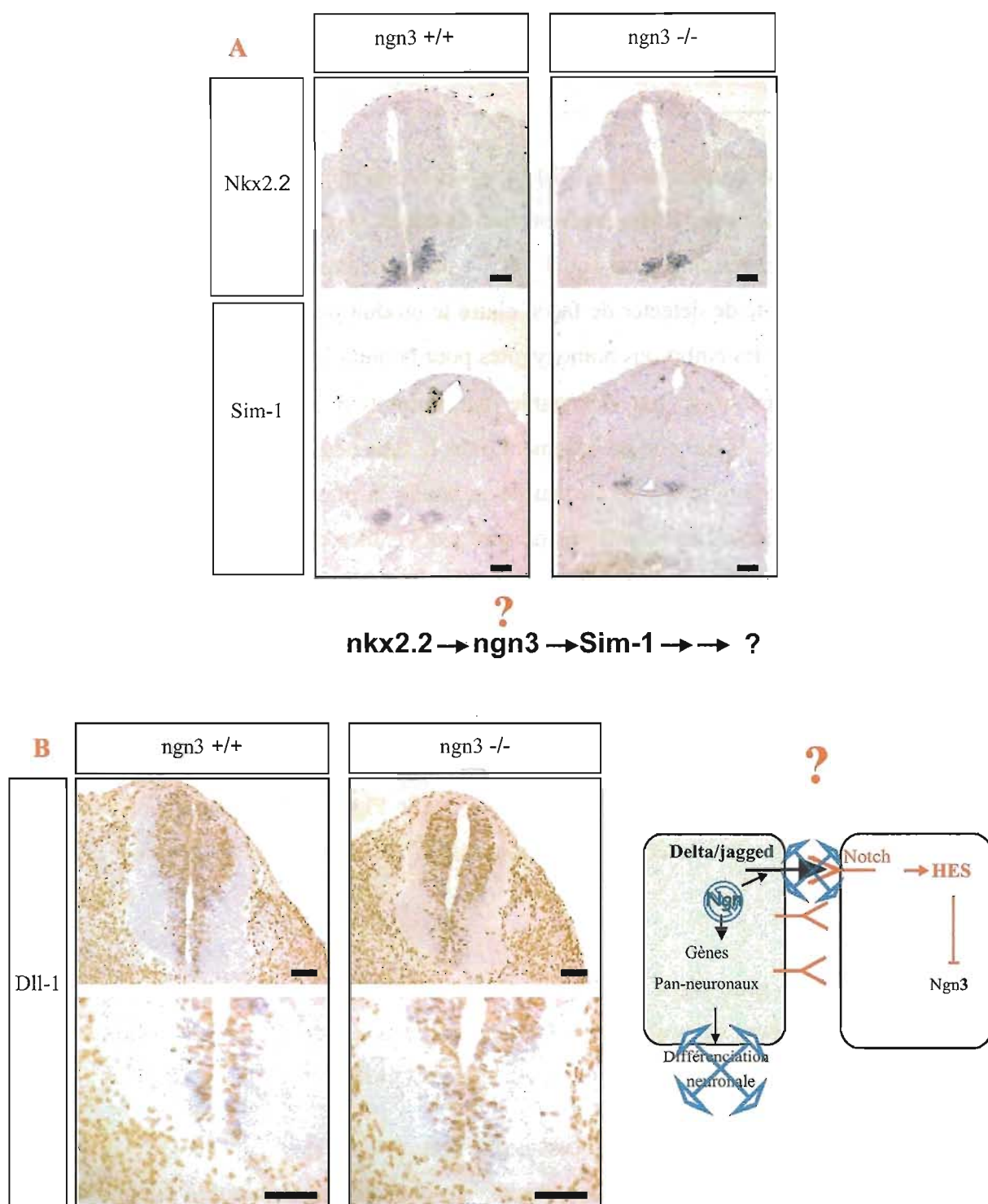


Figure 38 Caractérisation des domaines d'expression NKX2.2, Sim et Delta 1 chez le mutant ngn3

A : Comparaison des patrons d'expression des marqueurs NKX2.2 et Sim 1 dans le tube neural d'embryons de souris sauvages ($ngn3^{+/+}$) versus mutés pour les deux copies du gène $ngn3$ ($ngn3^{-/-}$).

B : Comparaison des patrons d'expression du marqueur delta 1 dans le tube neural d'embryons de souris sauvages ($ngn3^{+/+}$) versus mutés pour les deux copies du gène $ngn3$ ($ngn3^{-/-}$).

(A) Marquage obtenu par simple hybridation in situ et (B) marquage immuno-histochimique sur coupes fine (14 μ m).
Barre 50 μ m.

❖ Effet de la mutation de *ngn3* sur la spécification des neurones ventraux

Nous avons testé l'expression de gènes de spécification précoce des neurones les plus ventraux entre autres *NeuroD* et *Sim-1* au niveau du domaine p3. A ce niveau de la moelle épinière, aucun phénotype n'est observé. En effet, les territoires d'expression de NEUROD et SIM-1 ne sont pas affectés par la mutation de *Ngn3*.

- **Bilan:** Ces résultats ne sont pas en accord avec notre hypothèse de départ.

A ce stade de l'étude, nous nous sommes demandés si l'hypothèse initiale était caduque ou si un autre phénomène venait masquer les phénotypes que nous attendions. Dans ce dernier cas, la fonction de NGN3 serait compensée par celle d'un autre facteur proneural tel que NGN1, NGN2, MATH1 ou MASH1. Dans le cas contraire NGN3 ne serait pas un facteur de détermination neuronale.

5 Expression ectopique d'un autre facteur proneural induit par l'absence de NGN3

Nous avons analysé le patron d'expression des gènes proneuraux chez les embryons *Ngn3*^{+/+} et *Ngn3*^{-/-}. Les domaines d'expression de *Ngn1*, de *Ngn2* et de *Math-1* ne sont pas affectés dans la moelle épinière chez le mutant *ngn3*. Ainsi NGN1, NGN2 et MATH1 sont exclus du phénomène de compensation fonctionnelle supposé dans le territoire NGN3.

Il restait donc un dernier facteur proneural exprimé dans le tube neural susceptible de masquer le phénotype consécutif à l'absence de NGN3 : MASH1. Comme le montre la **Figure 39**, l'ARNm de *Mash1* est exprimé chez l'embryon sauvage dans une région vaste du neuroépithélium en position dorsale par rapport au territoire ventral de *Ngn3*.

La mutation *ngn3* induit une expression ectopique du facteur MASH1 strictement dans le domaine le plus ventral de la moelle épinière exprimant normalement NGN3 (domaine des progéniteurs V3). Il est donc possible qu'une compensation fonctionnelle due à l'expression anormale de *Mash1* soit à l'origine de l'absence d'effet observée.

A la lumière de ce résultat, nous avons d'une part repris l'étude du mutant *Ngn3*^{-/-} en recherchant les implications de cette expression ectopique de *Mash1* sur la spécification des

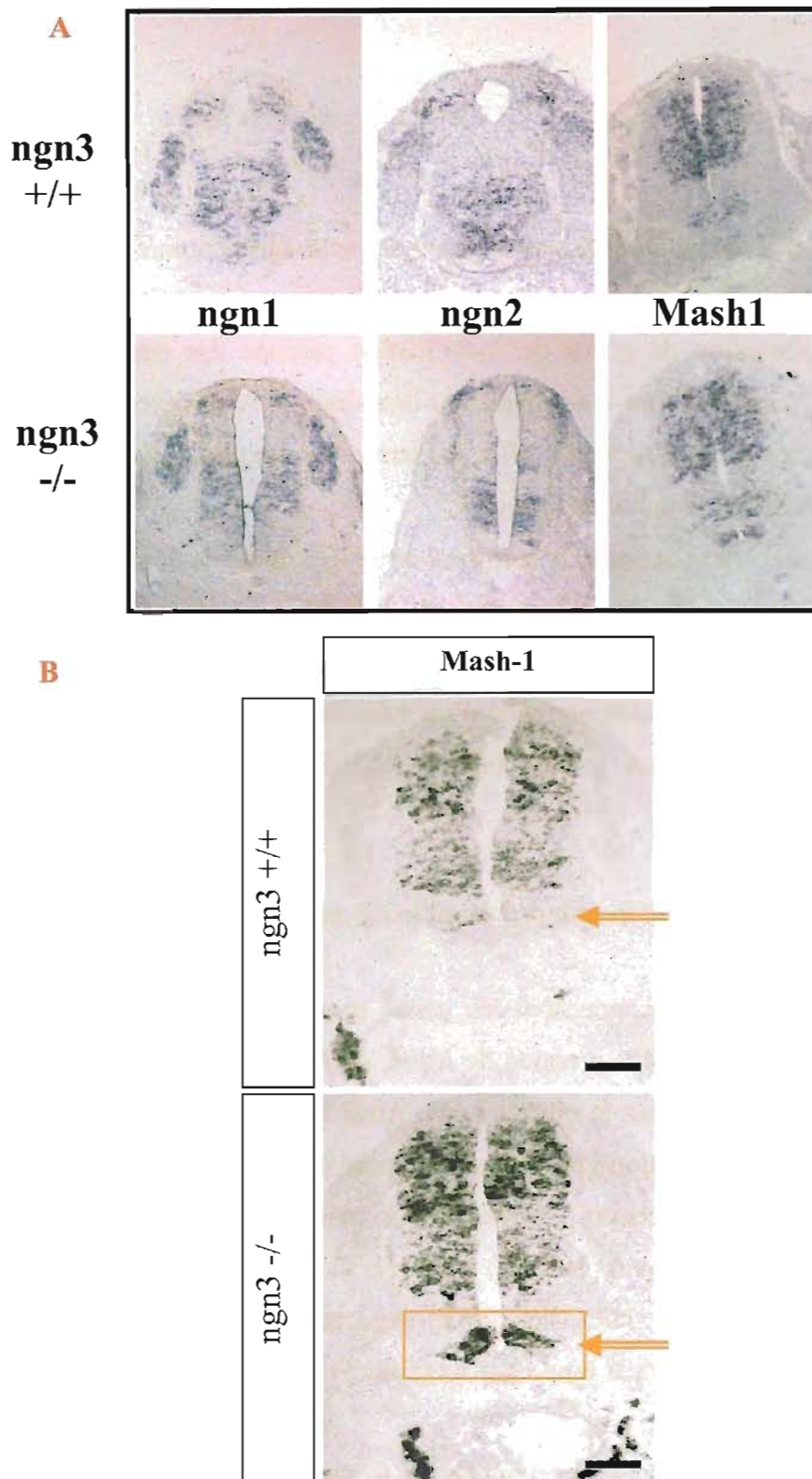


Figure 39 Recherche d'un candidate à la compensation fonctionnelle de ngn3 : Marquage ectopique de Mash1 dans le territoire ngn3 du mutant nul

A Patron d'expression de trois autres gènes proneuraux chez le mutant ngn3

B Zoom sur Mash1: Une expression ectopique de Mash1 dans le territoire d'expression de ngn3 chez le mutant homozygote est observée dans la région la plus ventrale de la moelle épinière.

Marquage par hybridation in situ. sur coupes fine (14µm).

Barre 50 µm.

progéniteurs contenus dans ce territoire. D'autre part, nous avons poursuivi cette étude en s'affranchissant de la compensation de *Mash1* (voir ci-après); en utilisant une lignée de souris portant la mutation nulle *Mash1* provenant du laboratoire de François Guillemot.

6 Compensation fonctionnelle

Compte tenu des résultats obtenus, il est possible d'interpréter différemment les données de la caractérisation du mutant *ngn3*. En effet, il est raisonnable de penser que dans le contexte de la mutation nulle *ngn3*, dans ce territoire contenant des progéniteurs V3, la fonction de détermination neuronale et donc l'engagement dans la voie de différenciation neuronale de ces précurseurs soit prise en charge vraisemblablement par le gène *Mash1*. Ainsi, les précurseurs du domaine V3 expriment la combinaison des gènes *Nkx2.2* et *Mash1* (et d'autres facteurs) en remplacement de *Nkx2.2* et *Ngn3*. Il est donc possible que ce changement de combinaison engendre une nouvelle spécification du devenir des précurseurs V3. En effet, chez le mutant *Ngn3*^{-/-} l'expression des gènes à homéodomaine de la famille *Lim* : *Islet1* et 2 est affectée. De plus, il apparaît des cellules nerveuses surnuméraires exprimant des marqueurs précoces de la différenciation des motoneurones.(voir **Figure 40**).

Le territoire d'expression de *Ngn3* est décrit comme étant réfractaire à la production de motoneurones (produit plus dorsalement). Cette nouvelle propriété pourrait alors être imputée à l'expression ectopique de *Mash1* qui agirait en re-spécifiant l'identité initiale des précurseurs spinaux concernés. Nous avons cherché à savoir si les motoneurones induit par *MASH1* dans la moelle épinière projettent dorsalement comme c'est le cas des neurones branchiomoteurs induit par *MASH1* dans le rhombencéphale. Pour cela, nous avons entrepris des expériences de traçage antéro/rétrograde, par injection d'un fluorochrome (DYE-I) dans les ganglions sensoriels, permettant de visualiser l'ensemble des projections neuronales de la moelle épinière. Dans ce cas, nous montrons que les motoneurones de la moelle épinière ne projettent pas leurs axones dorsalement. Il apparaît donc que les cellules nerveuses surnuméraires exprimant des marqueurs précoces de la différenciation des motoneurones chez le mutant *Ngn3* ne se comportent pas de façon similaire à ce que nous savons de la projection des motoneurones branchio-moteurs du rhombencéphale.

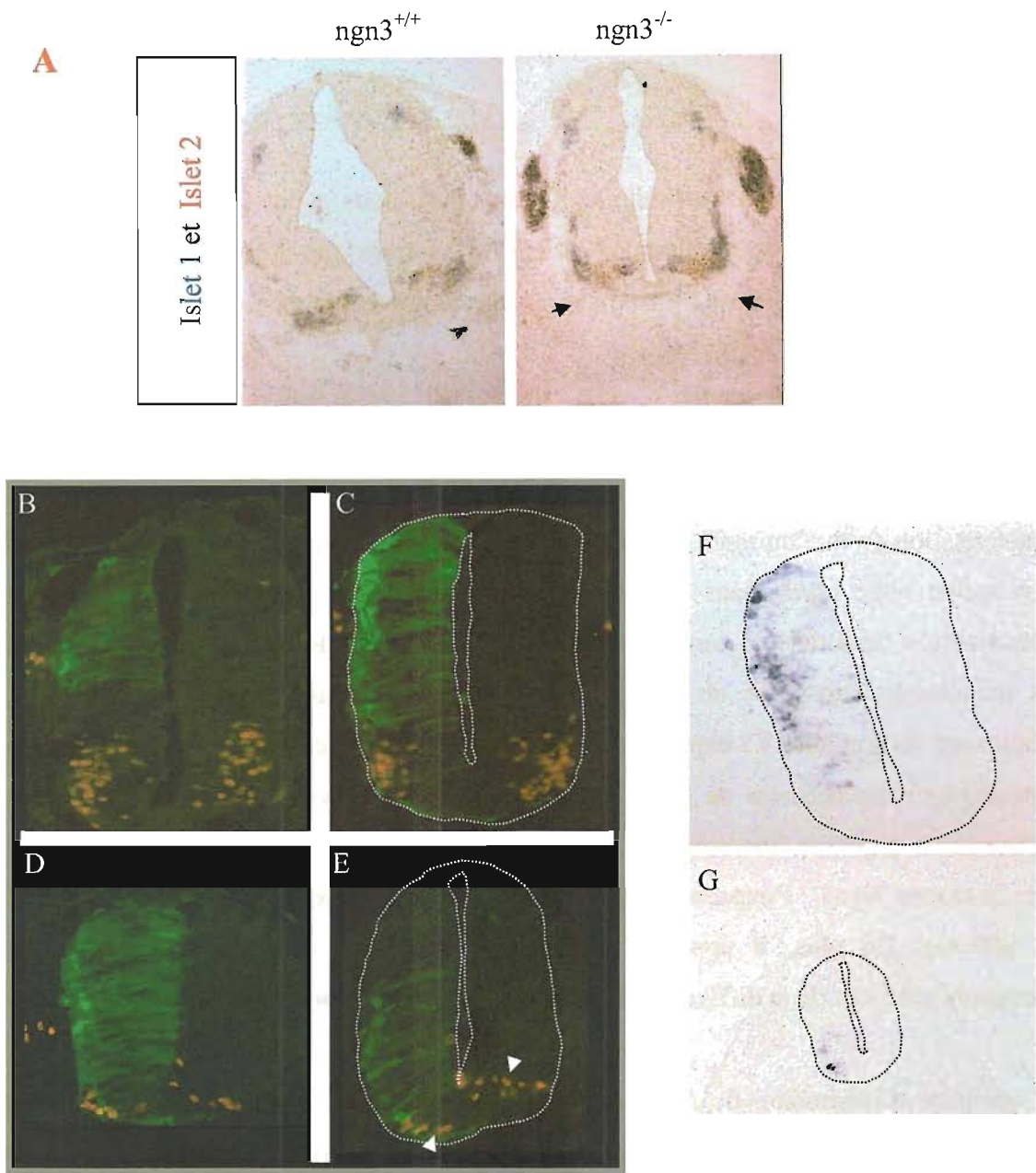


Figure 40 Analyse de l'expression des marqueurs Islet₁ et Islet₂ chez le mutant nul *ngn3* et par gain de fonction chez le poulet

A- Dans la moelle épinière d'embryons portant la mutation nulle *ngn3* à l'état homozygote. Les flèches noires montrent l'existence d'une population de neurones surnuméraires en différenciation exprimant exclusivement Islet₁ (flèches noires).

(A) Marquage par double hybridation in situ Islet1 (bleu) et Islet2 (rouge) sur des coupes transverses d'embryon de souris à E10.5.

B-G Analyse de la surexpression de *ngn3* par l'électroporation chez l'embryon de poulet

(B-E) marquage par double Immunofluorescence à l'aide des anticorps anti-Islet (Cy3) et anti-GFP (FITC). Le marquage GFP permet de visualiser les régions électroporées (figure B, C, E: régions électroporées dorsale et D, E, F: région ventrale électroporée).

(F-G) vérification de l'expression du marqueur *ngn3* dans les régions électroporées par hybridation in situ.

Il est raisonnable de penser que NGN3 pourrait empêcher la formation des motoneurones dans le domaine des progéniteurs p3. Pour tester cette hypothèse nous avons utilisé le modèle d'électroporation chez le poulet. Cette stratégie permet de surexprimer NGN3 d'un seul côté de la moelle épinière et d'analyser l'effet de ce gain de fonction par rapport au côté non électroporé. Les conséquences de la surexpression de NGN3 sont analysées en suivant la formation des motoneurones grâce aux marqueurs *Isl1* et *Isl2*. Des embryons de poulet de 14 somites ont été électroporés et analysés après 24 heures. Les résultats obtenus montrent une diminution importante du nombre de motoneurones en différenciation. Ainsi, l'expression forcée de NGN3 dans la région de la moelle épinière donnant naissance aux motoneurones perturbe fortement la formation de ces neurones. Ce résultat suggère que l'expression de *Ngn3* est capable d'empêcher la différenciation des motoneurones et assurerait le caractère réfractaire à la genèse de tels neurones dans le domaine des précurseurs p3 de la moelle épinière.

7 Analyse du double mutant *Ngn3/Mash1*

Nous venons de montrer qu'en absence de NGN3 dans la moelle épinière, MASH1 est exprimé de façon ectopique et vraisemblablement compense la fonction de NGN3. Il ne nous était donc pas directement possible de déterminer le rôle exacte de NGN3 dans ce territoire.

Pour cela, nous avons entrepris de générer une lignée double mutante invalidée pour *Mash1* et *ngn3* par croisement entre les deux lignées hétérozygotes *Ngn3* et *Mash1*.

7.1 Sélection de la lignée double mutante

Nous disposons donc des deux lignées nous permettant de générer le double mutant nous permettant d'observer les conséquences de la mutation de *ngn3* en l'absence de l'expression ectopique de MASH1.

Au moment où nous avons commencé à générer cette lignée, nous n'avions pas encore accès aux données des banques nous permettant de localiser la position chromosomique de ces deux marqueurs. Nous nous sommes donc aperçus expérimentalement qu'ils étaient liés et donc positionnés sur le même chromosome 10 (uniquement chez la souris). Leur distance ne favorise que rarement les recombinaisons multiples de type "crossing over" ne nous facilitant

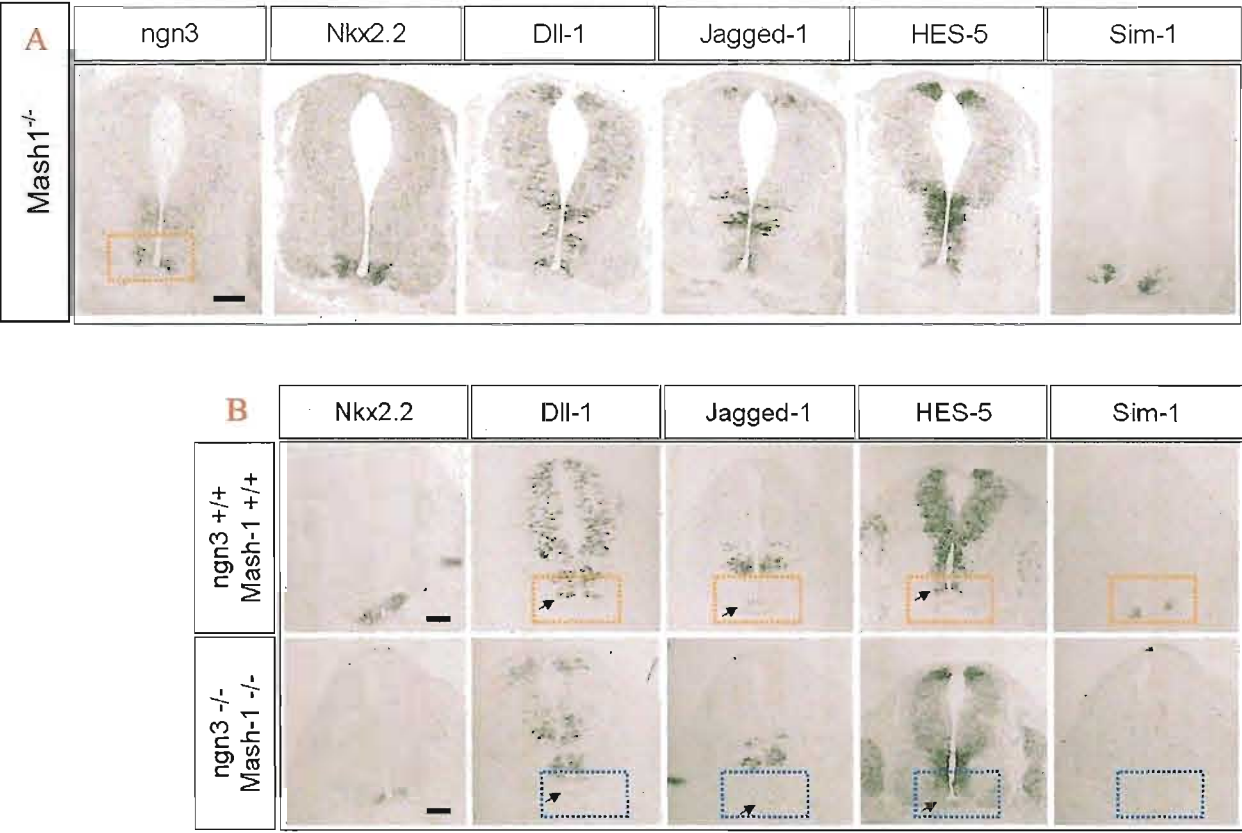


Figure 41 Comparaison des profils d'expression des marqueurs Nkx2.2, Dll1, Jagged-1; Hes5 et sim1

A- Chez le simple mutant Mash1^{-/-};
B- Chez le double sauvage Mash1^{+/+}/ngn3^{+/+} et le mutants Mash1^{-/-}/ngn3^{-/-}

Marquage par hybridation in situ sur coupes d'embryons mutants mash1, sauvages et double mutants

Barre 50µm

pas l'obtention de la lignée double mutante possédant la double mutation sur le même chromosome. Ainsi, l'obtention d'embryons doubles homozygotes mutés n'est possible qu'après deux événements de recombinaison chez les parents doubles hétérozygotes.

Cette étape de sélections a nécessité de nombreux mois pour génotyper tous les animaux obtenus. Après plusieurs phases de croisements, nous avons obtenu un fondateur portant les deux mutations sur le même haplotype nous permettant ainsi d'établir la lignée invalidée pour *Mash1* et *Ngn3*. Après amplification de cette nouvelle lignée nous avons obtenu des embryons portant les deux mutations à l'état homozygote. La double mutation n'entraîne pas de létalité embryonnaire.

7.2 Que ce passe-t-il dans le territoire le plus ventral de *Ngn3* en absence d'expression ectopique de *Mash1*?

Nous avons, dans un premier temps, analysé les conséquences de la mutation *Mash1* seule sur l'expression des gènes *Ngn3*, *Nkx2.2*, *Delta1* et *jagged1* à l'intérieur du territoire d'expression de *Ngn3*. Aucune variation de l'expression de ces gènes n'est détectée.

Une fois la lignée double mutante établie, nous avons analysé l'effet de l'absence combinée de MASH1 et NGN3 sur l'expression des marqueurs précédemment utilisés (§4) sur des embryons de 10,5 jours de développement. Les résultats sont présentés sur la planche (**Figure 41**).

Dans la région ventrale correspondant à la région des précurseurs p3, l'expression de MASH1 joue bien le rôle de compensation fonctionnelle. En effet, les résultats d'hybridation *in situ* chez le double mutant (en absence de l'action compensatrice de MASH1) montrent une altération de la voie d'inhibition latérale, visualisable par l'absence d'expression des ligands de Notch (ARNm *Delta1* et *Jagged1*) et de *Hes5* spécifiquement dans le territoire des précurseurs des V3. De plus, l'expression de *Sim1* marqueur de différenciation des interneurons V3 est entièrement abolie par la double mutation *ngn3-Mash1*.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenu permet de démontrer la fonction de détermination neuronale pour le gène *Ngn3*.

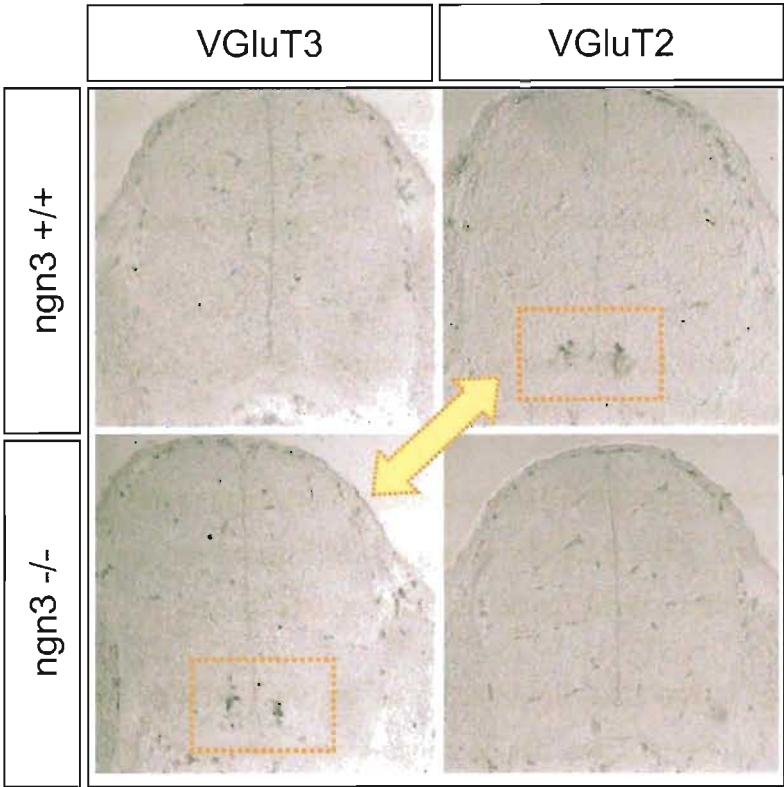


Figure 42 Analyse de l’expression des marqueurs Vglut₂ et Vglut₃ chez le mutant nul ngn3
Marquage par hybridation in situ sur des coupes transverses d'embryon de souris à E11.5 des deux population de transporteur vésiculaire du glutamate.

8 Phénotype terminal des cellules exprimant ngn3

L'étape suivante de ce travail a été de caractériser le devenir des cellules exprimant NGN3 en déterminant le phénotype terminal d'interneurones V3. Nous avons donc débuté cette approche du phénotype terminal des progéniteurs ngn3 par l'utilisation de souris rapportrices LacZ croisées avec les souris exprimant la CRE recombinase sous le contrôle du promoteur humain de NEUROG3 (lignée donnée par Pedro Herrera). Cependant, cette stratégie s'est avérée inefficace dans le SNC. En effet, la séquence promotrice utilisée pour diriger la recombinase CRE a été sélectionnée pour tracer le lignage pancréatique des cellules ngn3. Avec le recul des résultats que nous avons obtenu par transgénèse, nous savons maintenant que ce fragment n'est pas adapté pour tracer la population du territoire neuronal qui nous intéresse. Il sera intéressant d'utiliser d'autres fragments pour diriger l'expression de la CRE recombinase sur la base de nos résultats en transgénèse.

En absence d'outils permettant l'analyse du lignage des cellules ngn3, nous avons cherché à identifier les interneurones V3 en comparant l'expression de marqueurs de différenciation terminale chez le mutant Ngn3 par rapport au sauvage. Nous avons montré que le sous-type 2 des transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT2) est exprimé dans le même territoire que le gène *Sim-1*. Nous avons donc cherché à déterminer si certaines sous-populations de neurones glutamatergiques sont altérées par la mutation Ngn3. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Salah El Mestikawy. Nous avons déterminé que certains interneurones V3 (localisés dans la région d'expression de ngn3) sont des neurones glutamatergiques exprimant le transporteur vésiculaire du glutamate type-2 (VGLUT2). Cette population est absente à la fois chez le double mutant Ngn3-Mash-1 et chez le mutant Ngn3. De plus, chez le simple mutant Ngn3^{-/-} cette population est re-spécifiée et exprime un autre sous type de transporteurs vésiculaires du glutamate : VGLUT3. Ces résultats démontrent qu'au moins une proportion des interneurones V3 est glutamatergiques et expriment le transporteur VGLUT2.(voir **Figure 43**)

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette dernière partie de résultats nous a permis d'aborder la fonction de NGN3 dans le SNC. Notre hypothèse de travail initiale était que NGN3 est doté d'une fonction proneurale. Rappelons ici que la définition de fonction proneurale prend ces racines chez la drosophile. Cependant chez les vertébrés, les gènes proneuraux, malgré une conservation de fonction importante ont évolué et se trouvent impliqués dans d'autres mécanismes que nous avons détaillés dans l'introduction. Leurs fonctions dépassent largement la stricte définition de proneural puisqu'ils sont aussi impliqués, par exemple pour certains, dans la spécification des sous-types neuronaux.

Les arguments concernant NGN3 nous ayant permis de poser cette hypothèse proviennent de: **(i)** son patron d'expression exclusivement dans la zone neuroépithéliale et pendant les étapes de neurogenèse ; **(ii)** son appartenance à une famille de gène ayant acquis au cours de l'évolution une fonction proneurale qui n'existe pas chez leur homologue drosophilien biparous ; **(iii)** des premières expériences de gain de fonction chez l'embryon de xénope démontrant sa capacité à induire une hyperplasie neuronale.

Bien que les ARNm *Ngn3* soit exprimé dans plus régions du SNC, nous nous sommes intéressés à la moelle épinière, dont la particularité est d'être le seul domaine où ce facteur est le seul candidat à une fonction proneurale dans la région la plus ventrale. En effet, le territoire plus médian d'expression de *Ngn3* chevauche l'expression d'autres facteurs proneuraux tels que *Mash1* et *Ngn2*. Le fait que ce domaine ne comporte pas de redondance avec d'autres facteurs proneuraux connus laisse penser que la fonction de *ngn3* dans ce domaine est exclusive.

En résumé: le gain de fonction NGN3 entraîne chez le Xénope une hyperplasie neurale. Chez le poulet il démontre le caractère réfractaire à faire des motoneurones induits par l'expression de NGN3. La perte d'activité de NGN3 en absence de compensation fonctionnelle par MASH1; a pour conséquence un défaut de la genèse des cellules neuroépithéliales souches (jaune). Après division ces cellules donneraient les progéniteurs neuronaux déterminés (vert)

[dans notre cas des intermédiaires *sim1* puis une population *Vglut2*] d'une part, et d'autre part des précurseurs gliaux (bleu) [démontré par Lee et al en 2003].

Comme la fenêtre temporelle d'expression de *Ngn3* est située entre les phases de neurogenèse et de gliogenèse précoce; il est raisonnable de penser que NGN3 est impliqué précocement au cours de la neurogenèse et plus tardivement dans la différenciation des précurseurs gliaux.

La résultante de l'activité proneurale de NGN3 dans ces cellules est la genèse de progéniteurs que nous pourrions qualifier d'intermédiaires (passant par SIM-1 pour le lignage neuronal) qui se limitent à un destin neural (neuronal ou glial) lorsqu'ils quittent le neuroépithélium. En effet, nous avons montré qu'en absence de NGN3 sans compensation (double mutant), l'expression des ARNm *Nkx2.2* et de *Sim-1* (marqueur des interneurones V3) est perturbée.

Enfin, Lee et al. (2003) ont montré que l'expression des marqueurs matures du lignage glial (oligodendrocytes et astrocytes) est réduite et retardée chez le mutant *Ngn3*. De plus, *in vitro*, la protéine NGN3 est capable de diriger l'expression d'un gène rapporteur dont l'expression est contrôlée par un promoteur spécifique du lignage oligodendrocytaire (PLP) mais pas par un promoteur astrocytaire (GFAP). Ces résultats suggèrent un rôle de NGN3 dans la différenciation des précurseurs gliaux en oligodendrocytes (Lee *et al.*, 2003).

En perspective, il nous reste à effectuer le même travail pour les autres domaines d'expression de *ngn3* dans la moelle épinière, le rhomencéphale et dans l'hypothalamus. Dans cette dernière région, nous avons observé une disparition du domaine le plus ventral d'expression des ARNm de *NeuroD* chez le simple mutant *Ngn3*. Cette altération est spécifique des neurones catécholaminergiques les plus ventraux (exprimant la Tyrosine Hydroxylase) au niveau du noyau arqué.

Afin de caractériser le lignage des cellules NGN3 et de déterminer les marqueurs terminaux dans le territoire hypothalamique, nous pourrions utiliser le fragment de 2.2kb qui possède une forte pénétrance pour le domaine hypothalamique. Enfin, les nouvelles cassettes de transgenèse en cours d'obtention (notamment celle contenant la région en 3' du gène *Ngn3*) seront utiles pour l'analyse du devenir des cellules NGN3 dans l'ensemble des territoires du SNC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES

- Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, Pralong W, Aebischer P (2002) Lentiviral-mediated RNA interference. *Hum Gene Ther* 13:2197-2201.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Akazawa C, Sasai Y, Nakanishi S, Kageyama R (1992) Molecular characterization of a rat negative regulator with a basic helix-loop-helix structure predominantly expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem* 267:21879-21885.
- Akazawa C, Ishibashi M, Shimizu C, Nakanishi S, Kageyama R (1995) A mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal* is a positive transcriptional regulator expressed in the developing nervous system. *J Biol Chem* 270:8730-8738.
- Alders M, Hodges M, Hadjantonakis AK, Postmus J, van Wijk I, Blik J, de Meulemeester M, Westerveld A, Guillemot F, Oudejans C, et al. (1997) The human *Achaete-Scute* homologue 2 (*ASCL2*, *HASH2*) maps to chromosome 11p15.5, close to *IGF2* and is expressed in extravillous trophoblasts. *Hum Mol Genet* 6:859-867.
- Altmann CR, Brivanlou AH (2001) Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int Rev Cytol* 203:447-482.
- Andrew A, Rawdon BB (1990) Intestinal mesenchyme provokes differentiation of intestinal endocrine cells in gizzard endoderm. *Differentiation* 43:165-174.
- Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H (1999) Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400:877-881.
- Arnold HH, Winter B (1998) Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. *Curr Opin Genet Dev* 8:539-544.
- Artavanis-Tsakonas S, Muskavitch MA, Yedvobnick B (1983) Molecular cloning of Notch, a locus affecting neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1977-1981.
- Artavanis-Tsakonas S, Delidakis C, Fehon RG (1991) The Notch locus and the cell biology of neuroblast segregation. *Annu Rev Cell Biol* 7:427-452.
- Artavanis-Tsakonas S, Simpson P (1991) Choosing a cell fate: a view from the Notch locus. *Trends Genet* 7:403-408.
- Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME (1995) Notch signaling. *Science* 268:225-232.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776.
- Atchley WR, Fitch WM (1997) A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5172-5176.
- Ayuso E, Chillon M, Agudo J, Haurigot V, Bosch A, Carretero A, Otaegui PJ, Bosch F (2004) In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 15:805-812.
- Bae S, Bessho Y, Hojo M, Kageyama R (2000) The bHLH gene *Hes6*, an inhibitor of *Hes1*, promotes neuronal differentiation. *Development* 127:2933-2943.
- Baeyens L, Bonne S, German MS, Ravassard P, Heimberg H, Bouwens L (2006) *Ngn3* expression during postnatal in vitro beta cell neogenesis induced by the JAK/STAT pathway. *Cell Death Differ* 13:1892-1899.
- Bailey AM, Posakony JW (1995) Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes Dev* 9:2609-2622.

- Bain JR, Schisler JC, Takeuchi K, Newgard CB, Becker TC (2004) An adenovirus vector for efficient RNA interference-mediated suppression of target genes in insulinoma cells and pancreatic islets of langerhans. *Diabetes* 53:2190-2194.
- Baladron V, Ruiz-Hidalgo MJ, Nueda ML, Diaz-Guerra MJ, Garcia-Ramirez JJ, Bonvini E, Gubina E, Laborda J (2005) dlk acts as a negative regulator of Notch1 activation through interactions with specific EGF-like repeats. *Exp Cell Res* 303:343-359.
- Ball DW, Azzoli CG, Baylin SB, Chi D, Dou S, Donis-Keller H, Cumaraswamy A, Borges M, Nelkin BD (1993) Identification of a human achaete-scute homolog highly expressed in neuroendocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5648-5652.
- Ballester M, Castello A, Ibanez E, Sanchez A, Folch JM (2004) Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *Biotechniques* 37:610-613.
- Baonza A, Freeman M (2005) Control of cell proliferation in the *Drosophila* eye by Notch signaling. *Dev Cell* 8:529-539.
- Bartholoma A, Nave KA (1994) NEX-1: a novel brain-specific helix-loop-helix protein with autoregulation and sustained expression in mature cortical neurons. *Mech Dev* 48:217-228.
- Baudino TA, Cleveland JL (2001) The Max network gone mad. *Mol Cell Biol* 21:691-702.
- Becker TC, BeltrandelRio H, Noel RJ, Johnson JH, Newgard CB (1994) Overexpression of hexokinase I in isolated islets of Langerhans via recombinant adenovirus. Enhancement of glucose metabolism and insulin secretion at basal but not stimulatory glucose levels. *J Biol Chem* 269:21234-21238.
- Behringer RR, Nagy A, Gertsenstein M, Vintersen C (2003) *Manipulating the Mouse Embryo*, CSHL Press Edition.
- Bemelmans AP, Bonnel S, Houhou L, Dufour N, Nandrot E, Helmlinger D, Sarkis C, Abitbol M, Mallet J (2005) Retinal cell type expression specificity of HIV-1-derived gene transfer vectors upon subretinal injection in the adult rat: influence of pseudotyping and promoter. *J Gene Med* 7:1367-1374.
- Bemelmans AP, Husson I, Jaquet M, Mallet J, Kosofsky BE, Gressens P (2006) Lentiviral-mediated gene transfer of brain-derived neurotrophic factor is neuroprotective in a mouse model of neonatal excitotoxic challenge. *J Neurosci Res* 83:50-60.
- Ben-Arie N, Bellen HJ, Armstrong DL, McCall AE, Gordadze PR, Guo Q, Matzuk MM, Zoghbi HY (1997) Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature* 390:169-172.
- Ben-Arie N, Hassan BA, Bermingham NA, Malicki DM, Armstrong D, Matzuk M, Bellen HJ, Zoghbi HY (2000) Functional conservation of atonal and Math1 in the CNS and PNS. *Development* 127:1039-1048.
- Bermingham NA, Hassan BA, Price SD, Vollrath MA, Ben-Arie N, Eatock RA, Bellen HJ, Lysakowski A, Zoghbi HY (1999) Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284:1837-1841.
- Bermingham NA, Hassan BA, Wang VY, Fernandez M, Banfi S, Bellen HJ, Frittsch B, Zoghbi HY (2001) Proprioceptor pathway development is dependent on Math1. *Neuron* 30:411-422.
- Bertrand N, Castro DS, Guillemot F (2002) Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 3:517-530.
- Bettenhausen B, Hrabe de Angelis M, Simon D, Guenet JL, Gossler A (1995) Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of Dll1, a murine gene closely related to *Drosophila* Delta. *Development* 121:2407-2418.
- Birren S, Verdi J, Anderson D (1992) Membrane depolarization induces p140trk and NGF responsiveness, but not p75LNGFR, in MAH cells. *Science* 257:395-397.

- Blaugrund E, Pham TD, Tennyson VM, Lo L, Sommer L, Anderson DJ, Gershon MD (1996) Distinct subpopulations of enteric neuronal progenitors defined by time of development, sympathoadrenal lineage markers and Mash-1-dependence. *Development* 122:309-320.
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278:477-483.
- Boulianne GL, Livne-Bar I, Humphreys JM, Liang Y, Lin C, Rogaev E, St George-Hyslop P (1997) Cloning and characterization of the Drosophila presenilin homologue. *Neuroreport* 8:1025-1029.
- Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ (2003) The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci* 60:1376-1393.
- Brand-Saberi B (2005) Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. *Ann Anat* 187:199-207.
- Brand M, Jarman AP, Jan LY, Jan YN (1993) asense is a Drosophila neural precursor gene and is capable of initiating sense organ formation. *Development* 119:1-17.
- Brelje TC, Sorenson RL (1991) Role of prolactin versus growth hormone on islet B-cell proliferation in vitro: implications for pregnancy. *Endocrinology* 128:45-57.
- Brink C, Chowdhury K, Gruss P (2001) Pax4 regulatory elements mediate beta cell specific expression in the pancreas. *Mech Dev* 100:37-43.
- Brink C (2003) Promoter elements in endocrine pancreas development and hormone regulation. *Cell Mol Life Sci* 60:1033-1048.
- Brink C, Gruss P (2003) DNA sequence motifs conserved in endocrine promoters are essential for Pax4 expression. *Dev Dyn* 228:617-622.
- Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, Weidner K, Birchmeier W (1995) Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol* 131:1573-1586.
- Briscoe J, Sussel L, Serup P, Hartigan-O'Connor D, Jessell TM, Rubenstein JL, Ericson J (1999) Homeobox gene Nkx2.2 and specification of neuronal identity by graded Sonic hedgehog signalling. *Nature* 398:622-627.
- Briscoe J, Pierani A, Jessell TM, Ericson J (2000) A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 101:435-445.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5:207-216.
- Brown L, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, Siciliano MJ, Baer R (1992) HEN1 and HEN2: a subgroup of basic helix-loop-helix genes that are coexpressed in a human neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8492-8496.
- Brown NL, Dagenais SL, Chen CM, Glaser T (2002) Molecular characterization and mapping of ATOH7, a human atonal homolog with a predicted role in retinal ganglion cell development. *Mamm Genome* 13:95-101.
- Brunskill EW, Witte DP, Shreiner AB, Potter SS (1999) Characterization of npas3, a novel basic helix-loop-helix PAS gene expressed in the developing mouse nervous system. *Mech Dev* 88:237-241.
- Buchet D, Buc-Caron MH, Sabate O, Lachapelle F, Mallet J (2002a) Long-term fate of human telencephalic progenitor cells grafted into the adult mouse brain: effects of previous amplification in vitro. *J Neurosci Res* 68:276-283.
- Buchet D, Serguera C, Zennou V, Charneau P, Mallet J (2002b) Long-term expression of beta-glucuronidase by genetically modified human neural progenitor cells grafted into the mouse central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 19:389-401.

- Bush A, Hiromi Y, Cole M (1996) Biparous: a novel bHLH gene expressed in neuronal and glial precursors in *Drosophila*. *Dev Biol* 180:759-772.
- Cai L, Morrow EM, Cepko CL (2000) Misexpression of basic helix-loop-helix genes in the murine cerebral cortex affects cell fate choices and neuronal survival. *Development* 127:3021-3030.
- Campos-Ortega JA (1988) Cellular interactions during early neurogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Trends Neurosci* 11:400-405.
- Campos-Ortega JA (1998) The genetics of the *Drosophila* achaete-scute gene complex: a historical appraisal. *Int J Dev Biol* 42:291-297.
- Campuzano S, Carramolino L, Cabrera CV, Ruiz-Gomez M, Villares R, Boronat A, Modolell J (1985) Molecular genetics of the achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*. *Cell* 40:327-338.
- Carey RG, Li B, DiCicco-Bloom E (2002) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide anti-mitogenic signaling in cerebral cortical progenitors is regulated by p57Kip2-dependent CDK2 activity. *J Neurosci* 22:1583-1591.
- Carruthers S, Mason J, Papalopulu N (2003) Depletion of the cell-cycle inhibitor p27(Xic1) impairs neuronal differentiation and increases the number of ElrC(+) progenitor cells in *Xenopus tropicalis*. *Mech Dev* 120:607-616.
- Casarosa S, Fode C, Guillemot F (1999) Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon. *Development* 126:525-534.
- Castaing M, Peault B, Basmaciogullari A, Casal I, Czernichow P, Scharfmann R (2001) Blood glucose normalization upon transplantation of human embryonic pancreas into beta-cell-deficient SCID mice. *Diabetologia* 44:2066-2076.
- Castaing M, Duvillie B, Quemeneur E, Basmaciogullari A, Scharfmann R (2005a) Ex vivo analysis of acinar and endocrine cell development in the human embryonic pancreas. *Dev Dyn* 234:339-345.
- Castaing M, Guerci A, Mallet J, Czernichow P, Ravassard P, Scharfmann R (2005b) Efficient restricted gene expression in beta cells by lentivirus-mediated gene transfer into pancreatic stem/progenitor cells. *Diabetologia* 48:709-719.
- Cau E, Gradwohl G, Fode C, Guillemot F (1997) Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 124:1611-1621.
- Caudy M, Vassin H, Brand M, Tuma R, Jan LY, Jan YN (1988) daughterless, a *Drosophila* gene essential for both neurogenesis and sex determination, has sequence similarities to myc and the achaete-scute complex. *Cell* 55:1061-1067.
- Cepko CL (1999) The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr Opin Neurobiol* 9:37-46.
- Chen H, Thiagalingam A, Chopra H, Borges MW, Feder JN, Nelkin BD, Baylin SB, Ball DW (1997) Conservation of the *Drosophila* lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5355-5360.
- Cheng H, Leblond CP (1974) Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. III. Entero-endocrine cells. *Am J Anat* 141:503-519.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9578-9582.
- Chitnis A, Kintner C (1996) Sensitivity of proneural genes to lateral inhibition affects the pattern of primary neurons in *Xenopus* embryos. *Development* 122:2295-2301.
- Choi JB, Uchino H, Azuma K, Iwashita N, Tanaka Y, Mochizuki H, Migita M, Shimada T, Kawamori R, Watada H (2003) Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. *Diabetologia* 26:26.

- Choi T, Huang M, Gorman C, Jaenisch R (1991) A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 11:3070-3074.
- Chomette D, Frain M, Cereghini S, Charnay P, Ghislain J (2006) Krox20 hindbrain cis-regulatory landscape: interplay between multiple long-range initiation and autoregulatory elements. *Development* 133:1253-1262.
- Chong JA, Tapia-Ramirez J, Kim S, Toledo-Aral JJ, Zheng Y, Boutros MC, Altshuler YM, Frohman MA, Kraner SD, Mandel G (1995) REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* 80:949-957.
- Cirulli V, Beattie GM, Klier G, Ellisman M, Ricordi C, Quaranta V, Frasier F, Ishii JK, Hayek A, Salomon DR (2000) Expression and function of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in the developing pancreas: roles in the adhesion and migration of putative endocrine progenitor cells. *J Cell Biol* 150:1445-1460.
- Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G, Gruss P (2003) Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev* 17:2591-2603.
- Collombat P, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Mansouri A (2006) Specifying pancreatic endocrine cell fates. *Mech Dev* 123:501-512.
- Conlon RA, Reaume AG, Rossant J (1995) Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* 121:1533-1545.
- Cote F, Thevenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M, Ripoché MA, Bayard E, Hanoun N, Saurini F, Lechat P, et al. (2003) Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13525-13530.
- Cras-Meneur C, Elghazi L, Czernichow P, Scharfmann R (2001) Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. *Diabetes* 50:1571-1579.
- Cremisi F, Philpott A, Ohnuma S (2003) Cell cycle and cell fate interactions in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 13:26-33.
- Cross JC, Baczyk D, Dobric N, Hemberger M, Hughes M, Simmons DG, Yamamoto H, Kingdom JC (2003) Genes, development and evolution of the placenta. *Placenta* 24:123-130.
- Cserjesi P, Brown D, Lyons GE, Olson EN (1995) Expression of the novel basic helix-loop-helix gene eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development. *Dev Biol* 170:664-678.
- Csete ME, Benhamou PY, Drazan KE, Wu L, McIntee DF, Afra R, Mullen Y, Busuttill RW, Shaked A (1995) Efficient gene transfer to pancreatic islets mediated by adenoviral vectors. *Transplantation* 59:263-268.
- Cui XY, Hu QD, Tekaya M, Shimoda Y, Ang BT, Nie DY, Sun L, Hu WP, Karsak M, Duka T, et al. (2004) NB-3/Notch1 pathway via Deltex1 promotes neural progenitor cell differentiation into oligodendrocytes. *J Biol Chem* 279:25858-25865.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13:2905-2927.
- Davis LJ, Halazonetis TD (1993) Both the helix-loop-helix and the leucine zipper motifs of c-Myc contribute to its dimerization specificity with Max. *Oncogene* 8:125-132.
- Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, Weintraub H (1990) The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 60:733-746.
- Davis RL, Turner DL (2001) Vertebrate hairy and Enhancer of split related proteins: transcriptional repressors regulating cellular differentiation and embryonic patterning. *Oncogene* 20:8342-8357.

- Dawson SR, Turner DL, Weintraub H, Parkhurst SM (1995) Specificity for the hairy/enhancer of split basic helix-loop-helix (bHLH) proteins maps outside the bHLH domain and suggests two separable modes of transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 15:6923-6931.
- de la Pompa JL, Wakeham A, Correia KM, Samper E, Brown S, Aguilera RJ, Nakano T, Honjo T, Mak TW, Rossant J, et al. (1997) Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 124:1139-1148.
- de la Tour D, Halvorsen T, Demeterco C, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Loy M, Yoo SJ, Hao E, Bossie S, Levine F (2001) Beta-cell differentiation from a human pancreatic cell line in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol* 15:476-483.
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, et al. (1999) A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398:518-522.
- De Strooper B (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38:9-12.
- Deblandre GA, Wettstein DA, Koyano-Nakagawa N, Kintner C (1999) A two-step mechanism generates the spacing pattern of the ciliated cells in the skin of *Xenopus* embryos. *Development* 126:4715-4728.
- Deltour L, Leduque P, Paldi A, Ripoche MA, Dubois P, Jami J (1991) Polyclonal origin of pancreatic islets in aggregation mouse chimaeras. *Development* 112:1115-1121.
- Demeterco C, Levine F (2001) Gene therapy for diabetes. *Front Biosci* 6:D175-191.
- Desprez PY, Sumida T, Coppe JP (2003) Helix-loop-helix proteins in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8:225-239.
- Dessimoz J, Opoka R, Kordich JJ, Grapin-Botton A, Wells JM (2006) FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo. *Mech Dev* 123:42-55.
- Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS (2001) A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128:871-881.
- Dominguez M, Campuzano S (1993) asense, a member of the *Drosophila* achaete-scute complex, is a proneural and neural differentiation gene. *Embo J* 12:2049-2060.
- Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA, Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. (2004) Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation
- Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts
- Global expression analysis of gene regulatory pathways during endocrine pancreatic development
- Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation
- Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Nature* 429:41-46.
- Dubois L, Vincent A (2001) The COE--Collier/Olf1/EBF--transcription factors: structural conservation and diversity of developmental functions. *Mech Dev* 108:3-12.
- Durand B, Raff M (2000) A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *Bioessays* 22:64-71.
- Dussaud s (2003) Etude du promoteur ngn3 par Transgénèse classique. In, p 40. Paris: ENCPB.
- Duvillie B, Attali M, Aiello V, Quemeneur E, Scharfmann R (2003) Label-retaining cells in the rat pancreas: location and differentiation potential in vitro. *Diabetes* 52:2035-2042.
- Duvillie B, Attali M, Bounacer A, Ravassard P, Basmaciogullari A, Scharfmann R (2006) The mesenchyme controls the timing of pancreatic beta-cell differentiation. *Diabetes* 55:582-589.
- Ebert PJ, Timmer JR, Nakada Y, Helms AW, Parab PB, Liu Y, Hunsaker TL, Johnson JE (2003) Zic1 represses Math1 expression via interactions with the Math1 enhancer and modulation of Math1 autoregulation. *Development* 130:1949-1959.
- Eckner R, Yao TP, Oldread E, Livingston DM (1996) Interaction and functional collaboration of p300/CBP and bHLH proteins in muscle and B-cell differentiation. *Genes Dev* 10:2478-2490.

- Edlund H (2002) Pancreatic organogenesis--developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 3:524-532.
- Edlund T, Jessell TM (1999) Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96:211-224.
- Efrat S, Linde S, Kofod H, Spector D, Delannoy M, Grant S, Hanahan D, Baekkeskov S (1988) Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene-oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9037-9041.
- Ellenberger T, Fass D, Arnaud M, Harrison SC (1994) Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* 8:970-980.
- Ericson J, Rashbass P, Schedl A, Brenner-Morton S, Kawakami A, van Heyningen V, Jessell TM, Briscoe J (1997) Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90:169-180.
- Esni F, Johansson BR, Radice GL, Semb H (2001) Dorsal pancreas agenesis in N-cadherin- deficient mice. *Dev Biol* 238:202-212.
- Eum WS, Choung IS, Li MZ, Kang JH, Kim DW, Park J, Kwon HY, Choi SY (2004) HIV-1 Tat-mediated protein transduction of Cu,Zn-superoxide dismutase into pancreatic beta cells in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 37:339-349.
- Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS (2001) Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med* 345:971-980.
- Fantl V, Stamp G, Andrews A, Rosewell I, Dickson C (1995) Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. *Genes Dev* 9:2364-2372.
- Farah MH, Olson JM, Sucic HB, Hume RI, Tapscott SJ, Turner DL (2000) Generation of neurons by transient expression of neural bHLH proteins in mammalian cells. *Development* 127:693-702.
- Favier J, Kempf H, Corvol P, Gasc JM (1999) Cloning and expression pattern of EPAS1 in the chicken embryo. Colocalization with tyrosine hydroxylase. *FEBS Lett* 462:19-24.
- Fero ML, Rivkin M, Tasch M, Porter P, Carow CE, Firpo E, Polyak K, Tsai LH, Broudy V, Perlmutter RM, et al. (1996) A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85:733-744.
- Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK (1993) Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 363:38-45.
- Ferre-D'Amare AR, Pognonec P, Roeder RG, Burley SK (1994) Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF. *Embo J* 13:180-189.
- Ferreiro B, Skoglund P, Bailey A, Dorsky R, Harris WA (1993) XASH1, a Xenopus homolog of achaete-scute: a proneural gene in anterior regions of the vertebrate CNS. *Mech Dev* 40:25-36.
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246.
- Fields S, Sternglanz R (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10:286-292.
- Fisher AL, Caudy M (1998) Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Dev* 12:1931-1940.
- Fleming RJ (1998) Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin Cell Dev Biol* 9:599-607.
- Flotte T, Agarwal A, Wang J, Song S, Fenjves ES, Inverardi L, Chesnut K, Afione S, Loiler S, Wasserfall C, et al. (2001) Efficient ex vivo transduction of pancreatic islet cells with recombinant adeno-associated virus vectors. *Diabetes* 50:515-520.
- Fode C, Gradwohl G, Morin X, Dierich A, LeMeur M, Goridis C, Guillemot F (1998) The bHLH protein NEUROGENIN 2 is a determination factor for epibranchial placode-derived sensory neurons. *Neuron* 20:483-494.

- Fode C, Ma Q, Casarosa S, Ang SL, Anderson DJ, Guillemot F (2000) A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev* 14:67-80.
- Foley KP, Pruzina S, Winick JD, Engel JD, Grosveld F, Fraser P (1994) The chicken beta/epsilon-globin enhancer directs autonomously regulated, high-level expression of the chicken epsilon-globin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7252-7256.
- Fontaine J, Le Lievre C, Le Douarin NM (1977) What is the developmental fate of the neural crest cells which migrate into the pancreas in the avian embryo? *Gen Comp Endocrinol* 33:394-404.
- Fortini ME (2001) Notch and presenilin: a proteolytic mechanism emerges. *Curr Opin Cell Biol* 13:627-634.
- Fortini ME (2002) Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:673-684.
- Fraser P, Pruzina S, Antoniou M, Grosveld F (1993) Each hypersensitive site of the human beta-globin locus control region confers a different developmental pattern of expression on the globin genes. *Genes Dev* 7:106-113.
- Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Takebayashi H, Nakafuku M, Richardson W, Qiu M (2002) Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* 129:681-693.
- Gallichan WS, Kafri T, Krah T, Verma IM, Sarvetnick N (1998) Lentivirus-mediated transduction of islet grafts with interleukin 4 results in sustained gene expression and protection from insulinitis. *Hum Gene Ther* 9:2717-2726.
- Gannon M, Gamer LW, Wright CV (2001) Regulatory regions driving developmental and tissue-specific expression of the essential pancreatic gene *pdx1*. *Dev Biol* 238:185-201.
- Garvie CW, Wolberger C (2001) Recognition of specific DNA sequences. *Mol Cell* 8:937-946.
- Gautier P, Ledent V, Massaer M, Dambly-Chaudiere C, Ghysen A (1997) *tap*, a *Drosophila* bHLH gene expressed in chemosensory organs. *Gene* 191:15-21.
- Georgia S, Bhushan A (2004) Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest* 114:963-968.
- Ghislain J, Desmarquet-Trin-Dinh C, Jaegle M, Meijer D, Charnay P, Frain M (2002) Characterisation of cis-acting sequences reveals a biphasic, axon-dependent regulation of Krox20 during Schwann cell development. *Development* 129:155-166.
- Ghislain J, Desmarquet-Trin-Dinh C, Gilardi-Hebenstreit P, Charnay P, Frain M (2003) Neural crest patterning: autoregulatory and crest-specific elements co-operate for Krox20 transcriptional control. *Development* 130:941-953.
- Ghysen A, Dambly-Chaudiere C (1988) From DNA to form: the achaete-scute complex. *Genes Dev* 2:495-501.
- Ghysen A, Dambly-Chaudiere C (1989) Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends Genet* 5:251-255.
- Ghysen A, Dambly-Chaudiere C (1990) Early events in the development of *Drosophila* peripheral nervous system. *J Physiol (Paris)* 84:11-20.
- Ghysen A, Dambly-Chaudiere C, Jan LY, Jan YN (1993) Cell interactions and gene interactions in peripheral neurogenesis. *Genes Dev* 7:723-733.
- Giagtzoglou N, Alifragis P, Koumbanakis KA, Delidakis C (2003) Two modes of recruitment of E(spl) repressors onto target genes. *Development* 130:259-270.
- Gierl MS, Karoulias N, Wende H, Strehle M, Birchmeier C (2006) The zinc-finger factor *Insm1* (IA-1) is essential for the development of pancreatic beta cells and intestinal endocrine cells. *Genes Dev* 20:2465-2478.
- Gittes GK, Galante PE, Hanahan D, Rutter WJ, Debase HT (1996) Lineage-specific morphogenesis in the developing pancreas: role of mesenchymal factors. *Development* 122:439-447.
- Goldman MA (2004) RNAi for research and therapy. *Genome Biol* 5:342.

- Golosow N, Grobstein C (1962) Epitheliomesenchymal interaction in pancreatic morphogenesis. *Dev Biol* 4:242-255.
- Goodman RH, Smolik S (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14:1553-1577.
- Gordon JW, Ruddle FH (1981) Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214:1244-1246.
- Goulding SE, White NM, Jarman AP (2000a) *cato* encodes a basic helix-loop-helix transcription factor implicated in the correct differentiation of *Drosophila* sense organs. *Dev Biol* 221:120-131.
- Goulding SE, zur Lage P, Jarman AP (2000b) *amos*, a proneural gene for *Drosophila* olfactory sense organs that is regulated by *lozenge*. *Neuron* 25:69-78.
- Gowan K, Helms AW, Hunsaker TL, Collisson T, Ebert PJ, Odom R, Johnson JE (2001) Crossinhibitory activities of *Ngn1* and *Math1* allow specification of distinct dorsal interneurons. *Neuron* 31:219-232.
- Gradwohl G, Fode C, Guillemot F (1996) Restricted expression of a novel murine atonal-related bHLH protein in undifferentiated neural precursors. *Dev Biol* 180:227-241.
- Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F (2000) *neurogenin3* is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1607-1611.
- Grandbarbe L, Bouissac J, Rand M, Hrabe de Angelis M, Artavanis-Tsakonas S, Mohier E (2003) Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* 130:1391-1402.
- Grapin-Botton A, Melton DA (2000) Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* 16:124-130.
- Grapin-Botton A, Majithia AR, Melton DA (2001) Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev* 15:444-454.
- Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22:5442-5451.
- Gras C, Vinatier J, Amilhon B, Guerci A, Christov C, Ravassard P, Giros B, El Mestikawy S (2005) Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-natal life. *Neuropharmacology* 49:901-911.
- Grosveld F, De Boer E, Dillon N, Gribnau J, Milot E, Trimborn T, Wijgerde M, Fraser P (1998) The dynamics of globin gene expression and gene therapy vectors. *Ann N Y Acad Sci* 850:18-27.
- Gu G, Dubauskaite J, Melton DA (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129:2447-2457.
- Gu G, Brown JR, Melton DA (2003) Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 120:35-43.
- Guillemot F, Joyner AL (1993) Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue *Mash-1* in the developing nervous system. *Mech Dev* 42:171-185.
- Guillemot F, Lo LC, Johnson JE, Auerbach A, Anderson DJ, Joyner AL (1993) Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75:463-476.
- Guillemot F, Nagy A, Auerbach A, Rossant J, Joyner AL (1994) Essential role of *Mash-2* in extraembryonic development. *Nature* 371:333-336.
- Guillemot F (2000) Signaux extracellulaires et programmes transcriptionnels contrôlant la neurogenèse. *médecine/science* 16:159.
- Gupta BP, Rodrigues V (1997) Atonal is a proneural gene for a subset of olfactory sense organs in *Drosophila*. *Genes Cells* 2:225-233.

- Habener JF, Kemp DM, Thomas MK (2005) Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 146:1025-1034.
- Hagerkvist R, Mokhtari D, Myers JW, Tengholm A, Welsh N (2005) siRNA produced by recombinant dicer mediates efficient gene silencing in islet cells. *Ann N Y Acad Sci* 1040:114-122.
- Hahn ME (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 141:131-160.
- Haines N, Irvine KD (2003) Glycosylation regulates Notch signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:786-797.
- Halvorsen TL, Leibowitz G, Levine F (1999) Telomerase activity is sufficient to allow transformed cells to escape from crisis. *Mol Cell Biol* 19:1864-1870.
- Han J, Hall L, Rutter W (1986) Selective expression of rat pancreatic genes during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:110-114.
- Hartenstein V, Posakony JW (1989) Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* 107:389-405.
- Hassan BA, Bermingham NA, He Y, Sun Y, Jan YN, Zoghbi HY, Bellen HJ (2000) atonal regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the *Drosophila* brain. *Neuron* 25:549-561.
- Hasskarl J, Munger K (2002) Id proteins--tumor markers or oncogenes? *Cancer Biol Ther* 1:91-96.
- Hatakeyama J, Tomita K, Inoue T, Kageyama R (2001) Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* 128:1313-1322.
- Hatakeyama J, Kageyama R (2004) Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* 15:83-89.
- Haumaitre C, Barbacci E, Jenny M, Ott MO, Gradwohl G, Cereghini S (2005) Lack of TCF2/vHNF1 in mice leads to pancreas agenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:1490-1495.
- Haumaitre C, Fabre M, Cormier S, Baumann C, Delezoide AL, Cereghini S (2006) Severe pancreas hypoplasia and multicystic renal dysplasia in two human fetuses carrying novel HNF1beta/MODY5 mutations. *Hum Mol Genet* 15:2363-2375.
- Hayek A, Beattie GM (1997) Experimental transplantation of human fetal and adult pancreatic islets. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2471-2475.
- Hazhouz Y (2002) Dérivation et caractérisation de cellules neuroépithéliales d'embryons de souris portant la mutation nulle pour neurogénine 3. In, p 25. Paris: Institut de biochimie et de biologie appliquée-Université de Caen.
- Hebrok M, Kim SK, Melton DA (1998) Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 12:1705-1713.
- Heese K, Yamada T, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y, Sawada T (2004) Characterizing the new transcription regulator protein p60TRP. *J Cell Biochem* 91:1030-1042.
- Heitzler P, Simpson P (1991) The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64:1083-1092.
- Heitzler P, Bourouis M, Ruel L, Carteret C, Simpson P (1996) Genes of the Enhancer of split and achaete-scute complexes are required for a regulatory loop between Notch and Delta during lateral signalling in *Drosophila*. *Development* 122:161-171.
- Heller RS, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen OD, Mellitzer G, Gradwohl G, Serup P (2005) Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev Biol* 286:217-224.
- Helms AW, Johnson JE (1998) Progenitors of dorsal commissural interneurons are defined by MATH1 expression. *Development* 125:919-928.
- Helms AW, Abney AL, Ben-Arie N, Zoghbi HY, Johnson JE (2000) Autoregulation and multiple enhancers control Math1 expression in the developing nervous system. *Development* 127:1185-1196.

- Herrera PL, Huarte J, Zufferey R, Nichols A, Mermillod B, Philippe J, Muniesa P, Sanvito F, Orci L, Vassalli JD (1994) Ablation of islet endocrine cells by targeted expression of hormone-promoter-driven toxigenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12999-13003.
- Herrera PL (2000) Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127:2317-2322.
- Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 21:RC181.
- Herzog E, Gilchrist J, Gras C, Muzerelle A, Ravassard P, Giros B, Gaspar P, El Mestikawy S (2004) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 123:983-1002.
- Hill DJ, Duvillie B (2000) Pancreatic development and adult diabetes. *Pediatr Res* 48:269-274.
- Hitoshi S, Seaberg RM, Kosciuk C, Alexson T, Kusunoki S, Kanazawa I, Tsuji S, van der Kooy D (2004) Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signaling. *Genes Dev* 18:1806-1811.
- Hocker M, Wiedenmann B (1998) Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 859:160-174.
- Hoffmann MW, Allison J, Miller JF (1992) Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2526-2530.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy Et (1994) Manipulating the mouse embryo: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hoppe PE, Greenspan RJ (1986) Local function of the Notch gene for embryonic ectodermal pathway choice in *Drosophila*. *Cell* 46:773-783.
- Horton S, Meredith A, Richardson JA, Johnson JE (1999) Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor MASH1. *Mol Cell Neurosci* 14:355-369.
- Hrabe de Angelis M, McIntyre J, 2nd, Gossler A (1997) Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386:717-721.
- Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, Chu K, Jamrich M, Tsai MJ (2000a) Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 20:3292-3307.
- Huang ML, Hsu CH, Chien CT (2000b) The proneural gene amos promotes multiple dendritic neuron formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Neuron* 25:57-67.
- Iavarone A, Lasorella A (2004) Id proteins in neural cancer. *Cancer Lett* 204:189-196.
- Inoue C, Bae SK, Takatsuka K, Inoue T, Bessho Y, Kageyama R (2001) Math6, a bHLH gene expressed in the developing nervous system, regulates neuronal versus glial differentiation. *Genes Cells* 6:977-986.
- Inoue T, Hojo M, Bessho Y, Tano Y, Lee JE, Kageyama R (2002) Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* 129:831-842.
- Ishihara H, Asano T, Tsukuda K, Katagiri H, Inukai K, Anai M, Kikuchi M, Yazaki Y, Miyazaki JI, Oka Y (1993) Pancreatic beta cell line MIN6 exhibits characteristics of glucose metabolism and glucose-stimulated insulin secretion similar to those of normal islets. *Diabetologia* 36:1139-1145.
- Iso T, Kedes L, Hamamori Y (2003) HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* 194:237-255.
- Jacquemin P, Durvieux SM, Jensen J, Godfraind C, Gradwohl G, Guillemot F, Madsen OD, Carmeliet P, Dewerchin M, Collen D, et al. (2000) Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene ngn3. *Mol Cell Biol* 20:4445-4454.

- Jacquemin P, Yoshitomi H, Kashima Y, Rousseau GG, Lemaigre FP, Zaret KS (2006) An endothelial-mesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. *Dev Biol* 290:189-199.
- Jarman AP, Grau Y, Jan LY, Jan YN (1993) atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell* 73:1307-1321.
- Jarman AP, Grell EH, Ackerman L, Jan LY, Jan YN (1994) Atonal is the proneural gene for *Drosophila* photoreceptors. *Nature* 369:398-400.
- Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A (1995) Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 377:355-358.
- Jasoni CL, Walker MB, Morris MD, Reh TA (1994) A chicken achaete-scute homolog (CASH-1) is expressed in a temporally and spatially discrete manner in the developing nervous system. *Development* 120:769-783.
- Jen WC, Gavantka V, Pollet N, Niehrs C, Kintner C (1999) Periodic repression of Notch pathway genes governs the segmentation of *Xenopus* embryos. *Genes Dev* 13:1486-1499.
- Jenny M, Uhl C, Roche C, Duluc I, Guillermin V, Guillemot F, Jensen J, Kedinger M, Gradwohl G (2002) Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *Embo J* 21:6338-6347.
- Jensen J, Heller RS, Funder-Nielsen T, Pedersen EE, Lindsell C, Weinmaster G, Madsen OD, Serup P (2000a) Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: a role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 49:163-176.
- Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, Kageyama R, Guillemot F, Serup P, Madsen OD (2000b) Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* 24:36-44.
- Jensen JN, Cameron E, Garay MV, Starkey TW, Gianani R, Jensen J (2005) Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128:728-741.
- Jessell TM (2000) Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.
- Jimenez F, Campos-Ortega JA (1990) Defective neuroblast commitment in mutants of the achaete-scute complex and adjacent genes of *D. melanogaster*. *Neuron* 5:81-89.
- Johnson JE, Birren SJ, Anderson DJ (1990) Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* 346:858-861.
- Johnson JE, Zimmerman K, Saito T, Anderson DJ (1992) Induction and repression of mammalian achaete-scute homologue (MASH) gene expression during neuronal differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Development* 114:75-87.
- Jonsson M, Bjornorp Mark E, Brantsing C, Brandner JM, Lindahl A, Asp J (2004) Hash4, a novel human achaete-scute homologue found in fetal skin. *Genomics* 84:859-866.
- Ju Q, Edelstein D, Brendel MD, Brandhorst D, Brandhorst H, Bretzel RG, Brownlee M (1998) Transduction of non-dividing adult human pancreatic beta cells by an integrating lentiviral vector. *Diabetologia* 41:736-739.
- Kaestner KH, Lee CS, Scearce LM, Brestelli JE, Arsenlis A, Le PP, Lantz KA, Crabtree J, Pizarro A, Mazzarelli J, et al. (2003) Transcriptional program of the endocrine pancreas in mice and humans. *Diabetes* 52:1604-1610.
- Kageyama R, Nakanishi S (1997) Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Curr Opin Genet Dev* 7:659-665.
- Kageyama R, Ohtsuka T, Hatakeyama J, Ohsawa R (2005) Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res* 306:343-348.

- Kanekar S, Perron M, Dorsky R, Harris WA, Jan LY, Jan YN, Vetter ML (1997) Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing *Xenopus* retina. *Neuron* 19:981-994.
- Kaneta M, Osawa M, Sudo K, Nakauchi H, Farr AG, Takahama Y (2000) A role for pref-1 and HES-1 in thymocyte development. *J Immunol* 164:256-264.
- Kapturczak M, Zolotukhin S, Cross J, Pileggi A, Molano RD, Jorgensen M, Byrne B, Flotte TR, Ellis T, Inverardi L, et al. (2002) Transduction of human and mouse pancreatic islet cells using a bicistronic recombinant adeno-associated viral vector. *Mol Ther* 5:154-160.
- Kapturczak MH, Flotte T, Atkinson MA (2001) Adeno-associated virus (AAV) as a vehicle for therapeutic gene delivery: improvements in vector design and viral production enhance potential to prolong graft survival in pancreatic islet cell transplantation for the reversal of type 1 diabetes. *Curr Mol Med* 1:245-258.
- Kemp DM, Thomas MK, Habener JF (2003) Developmental aspects of the endocrine pancreas. *Rev Endocr Metab Disord* 4:5-17.
- Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A (2004) The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 36:189-204.
- Kiefer H, Chatail-Hermitte F, Ravassard P, Bayard E, Brunet I, Mallet J (2005) ZENON, a novel POZ Kruppel-like DNA binding protein associated with differentiation and/or survival of late postmitotic neurons. *Mol Cell Biol* 25:1713-1729.
- Kim S, Hebrok M, Melton D (1997) Notochord to endoderm signaling is required for pancreas development. *Development* 124:4243-4252.
- Kim SK, Hebrok M (2001) Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 15:111-127.
- Kim SK, MacDonald RJ (2002) Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 12:540-547.
- Kimble J, Simpson P (1997) The LIN-12/Notch signaling pathway and its regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13:333-361.
- Kishi M, Mizuseki K, Sasai N, Yamazaki H, Shiota K, Nakanishi S, Sasai Y (2000) Requirement of Sox2-mediated signaling for differentiation of early *Xenopus* neuroectoderm. *Development* 127:791-800.
- Kissinger CR, Liu BS, Martin-Blanco E, Kornberg TB, Pabo CO (1990) Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63:579-590.
- Kobinger GP, Deng S, Louboutin JP, Vatamaniuk M, Matschinsky F, Markmann JF, Raper SE, Wilson JM (2004) Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 15:211-219.
- Kondo T, Raff M (2000) Basic helix-loop-helix proteins and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Development* 127:2989-2998.
- Kophengnavong T, Michnowicz JE, Blackwell TK (2000) Establishment of distinct MyoD, E2A, and twist DNA binding specificities by different basic region-DNA conformations. *Mol Cell Biol* 20:261-272.
- Koyano-Nakagawa N, Kim J, Anderson D, Kintner C (2000) Hes6 acts in a positive feedback loop with the neurogenins to promote neuronal differentiation. *Development* 127:4203-4216.
- Kruger M, Braun T (2002) The neuronal basic helix-loop-helix transcription factor NSCL-1 is dispensable for normal neuronal development. *Mol Cell Biol* 22:792-800.
- Kruger M, Ruschke K, Braun T (2004) NSCL-1 and NSCL-2 synergistically determine the fate of GnRH-1 neurons and control *necdin* gene expression. *Embo J* 23:4353-4364.
- Kumar M, Melton D (2003) Pancreas specification: a budding question. *Curr Opin Genet Dev* 13:401-407.

- Kume H, Maruyama K, Tomita T, Iwatsubo T, Saido TC, Obata K (1996) Molecular cloning of a novel basic helix-loop-helix protein from the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 219:526-530.
- Kury P, Greiner-Petter R, Cornely C, Jurgens T, Muller HW (2002) Mammalian achaete scute homolog 2 is expressed in the adult sciatic nerve and regulates the expression of Krox24, Mob-1, CXCR4, and p57kip2 in Schwann cells. *J Neurosci* 22:7586-7595.
- Lamar E, Kintner C, Goulding M (2001) Identification of NKL, a novel Gli-Kruppel zinc-finger protein that promotes neuronal differentiation. *Development* 128:1335-1346.
- Lammert E, Cleaver O, Melton D (2001) Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294:564-567.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.
- Landry M, Bouali-Benazzouz R, El Mestikawy S, Ravassard P, Nagy F (2004) Expression of vesicular glutamate transporters in rat lumbar spinal cord, with a note on dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 468:380-394.
- Le Douarin NM (1988) On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell* 53:169-171.
- Leber SM, Sanes JR (1995) Migratory paths of neurons and glia in the embryonic chick spinal cord. *J Neurosci* 15:1236-1248.
- Lecomte MJ, De Gois S, Guerci A, Ravassard P, Faucon Biguet N, Mallet J, Berrard S (2005) Differential expression and regulation of the high-affinity choline transporter CHT1 and choline acetyltransferase in neurons of superior cervical ganglia. *Mol Cell Neurosci* 28:303-313.
- Lecourtois M, Schweisguth F (1995) The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. *Genes Dev* 9:2598-2608.
- Ledent V, Gaillard F, Gautier P, Ghysen A, Dambly-Chaudiere C (1998) Expression and function of tap in the gustatory and olfactory organs of *Drosophila*. *Int J Dev Biol* 42:163-170.
- Ledent V, Vervoort M (2001) The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res* 11:754-770.
- Ledent V, Paquet O, Vervoort M (2002) Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* 3:RESEARCH0030.
- Ledduque P, Scharfmann R, Chayvialle JA, Aratan-Spire S, Basmaciogullari A, Czernichow P, Dubois PM (1992) Insulin, glucagon and somatostatin in fetal rat islets maintained free-floating in culture: immunocytochemistry and radioimmunoassay. *Biol Cell* 74:179-185.
- Lee CS, Perreault N, Brestelli JE, Kaestner KH (2002) Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Genes Dev* 16:1488-1497.
- Lee J, Wu Y, Qi Y, Xue H, Liu Y, Scheel D, German M, Qiu M, Guillemot F, Rao M, et al. (2003) Neurogenin3 participates in gliogenesis in the developing vertebrate spinal cord. *Dev Biol* 253:84-98.
- Lee JC, Smith SB, Watada H, Lin J, Scheel D, Wang J, Mirmira RG, German MS (2001) Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene neurogenin3. *Diabetes* 50:928-936.
- Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H (1995) Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268:836-844.
- Lee JE (1997) Basic helix-loop-helix genes in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 7:13-20.
- Lee KJ, Jessell TM (1999) The specification of dorsal cell fates in the vertebrate central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 22:261-294.

- Lee SK, Pfaff SL (2003) Synchronization of neurogenesis and motor neuron specification by direct coupling of bHLH and homeodomain transcription factors. *Neuron* 38:731-745.
- Lee SK, Lee B, Ruiz EC, Pfaff SL (2005) Olig2 and Ngn2 function in opposition to modulate gene expression in motor neuron progenitor cells. *Genes Dev* 19:282-294.
- Leibowitz G, Beattie GM, Kafri T, Cirulli V, Lopez AD, Hayek A, Levine F (1999) Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. *Diabetes* 48:745-753.
- Lemerrier C, To RQ, Swanson BJ, Lyons GE, Konieczny SF (1997) Mist1: a novel basic helix-loop-helix transcription factor exhibits a developmentally regulated expression pattern. *Dev Biol* 182:101-113.
- Levine EM, Close J, Fero M, Ostrovsky A, Reh TA (2000) p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. *Dev Biol* 219:299-314.
- Levison SW, Goldman JE (1997) Multipotential and lineage restricted precursors coexist in the mammalian perinatal subventricular zone. *J Neurosci Res* 48:83-94.
- Li L, Vaessin H (2000) Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev* 14:147-151.
- Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G (1995) Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell* 80:909-917.
- Lindsell CE, Boulter J, diSibio G, Gossler A, 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.
- Lissemore JL, Starmer WT (1999) Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins. *Mol Phylogenet Evol* 11:308-319.
- Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD, Rowitch DH (2000) Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron* 25:317-329.
- Lu QR, Sun T, Zhu Z, Ma N, Garcia M, Stiles CD, Rowitch DH (2002) Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109:75-86.
- Luscher B (2001) Function and regulation of the transcription factors of the Myc/Max/Mad network. *Gene* 277:1-14.
- Lutolf S, Radtke F, Aguet M, Suter U, Taylor V (2002) Notch1 is required for neuronal and glial differentiation in the cerebellum. *Development* 129:373-385.
- Ma Q, Kintner C, Anderson DJ (1996) Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell* 87:43-52.
- Ma Q, Chen Z, del Barco Barrantes I, de la Pompa JL, Anderson DJ (1998) neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20:469-482.
- Ma Q, Fode C, Guillemot F, Anderson DJ (1999) Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev* 13:1717-1728.
- Marin O, Rubenstein JL (2003) Cell migration in the forebrain. *Annu Rev Neurosci* 26:441-483.
- Marmorstein R, Fitzgerald MX (2003) Modulation of DNA-binding domains for sequence-specific DNA recognition. *Gene* 304:1-12.
- Martin M, Gallego-Llamas J, Ribes V, Kedinger M, Niederreither K, Chambon P, Dolle P, Gradwohl G (2005) Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient *Raldh2* mutant mice. *Dev Biol* 284:399-411.
- Massari ME, Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20:429-440.

- Matter-Sadzinski L, Matter JM, Ong MT, Hernandez J, Ballivet M (2001) Specification of neurotransmitter receptor identity in developing retina: the chick ATH5 promoter integrates the positive and negative effects of several bHLH proteins. *Development* 128:217-231.
- McCabe C, Samali A, O'Brien T (2006) Cytoprotection of beta cells: rational gene transfer strategies. *Diabetes Metab Res Rev* 22:241-252.
- Mellitzer G, Bonne S, Luco RF, Van De Casteele M, Lenne-Samuel N, Collombat P, Mansouri A, Lee J, Lan M, Pipeleers D, et al. (2006) IA1 is NGN3-dependent and essential for differentiation of the endocrine pancreas. *Embo J* 25:1344-1352.
- Miettinen PJ, Huotari M, Koivisto T, Ustinov J, Palgi J, Rasilainen S, Lehtonen E, Keski-Oja J, Otonkoski T (2000) Impaired migration and delayed differentiation of pancreatic islet cells in mice lacking EGF-receptors. *Development* 127:2617-2627.
- Miralles F, Battelino T, Czernichow P, Scharfmann R (1998a) TGF-beta plays a key role in morphogenesis of the pancreatic islets of Langerhans by controlling the activity of the matrix metalloproteinase MMP-2. *J Cell Biol* 143:827-836.
- Miralles F, Czernichow P, Scharfmann R (1998b) Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development* 125:1017-1024.
- Miyamoto T, Jinno Y, Sasaki T, Ikeda Y, Masuzaki H, Niikawa N, Ishikawa M (1996) Genomic cloning and localization to chromosome 11p15.5 of the human achaete-scute homolog 2 (ASCL2). *Cytogenet Cell Genet* 73:312-314.
- Miyazaki J, Araki K, Yamato E, Ikegami H, Asano T, Shibasaki Y, Oka Y, Yamamura K (1990) Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms. *Endocrinology* 127:126-132.
- Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, 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.
- Moore AW, Barbel S, Jan LY, Jan YN (2000) A genomewide survey of basic helix-loop-helix factors in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10436-10441.
- Moore WM, Bannister RP, Ward BS, Hillier VF, Bamford FN (1995) Fetal and postnatal growth to age 2 years by mother's country of birth. *Early Hum Dev* 42:111-121.
- Morrow EM, Furukawa T, Lee JE, Cepko CL (1999) NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* 126:23-36.
- Muhr J, Andersson E, Persson M, Jessell TM, Ericson J (2001) Groucho-mediated transcriptional repression establishes progenitor cell pattern and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell* 104:861-873.
- Munsick RA (1984) Human fetal extremity lengths in the interval from 9 to 21 menstrual weeks of pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 149:883-887.
- Murray RC, Tapscott SJ, Petersen JW, Calof AL, McCormick MB (2000) A fragment of the Neurogenin1 gene confers regulated expression of a reporter gene in vitro and in vivo. *Dev Dyn* 218:189-194.
- Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, et al. (1989) Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.
- Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME, Matthews JR, Quong MW, Rivera RR, Stuver MH (1994) Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta* 1218:129-135.
- Murre C (2005) Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat Immunol* 6:1079-1086.

- Mutoh H, Naya FJ, Tsai MJ, Leiter AB (1998) The basic helix-loop-helix protein BETA2 interacts with p300 to coordinate differentiation of secretin-expressing enteroendocrine cells. *Genes Dev* 12:820-830.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8424-8428.
- Nakada Y, Parab P, Simmons A, Omer-Abdalla A, Johnson JE (2004) Separable enhancer sequences regulate the expression of the neural bHLH transcription factor neurogenin 1. *Dev Biol* 271:479-487.
- Nakagawa O, McFadden DG, Nakagawa M, Yanagisawa H, Hu T, Srivastava D, Olson EN (2000) Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13655-13660.
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K (1996) Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85:707-720.
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11382-11388.
- Nardelli J, Catala M, Charnay P (2003) Establishment of embryonic neuroepithelial cell lines exhibiting an epiplastic expression pattern of region specific markers. *J Neurosci Res* 73:737-752.
- Narushima M, Okitsu T, Miki A, Yong C, Kobayashi K, Yonekawa Y, Tanaka K, Ikeda H, Matsumoto S, Tanaka N, et al. (2004) Adenovirus mediated gene transduction of primarily isolated mouse islets. *Asaio J* 50:586-590.
- Naya F, Stellrecht C, Tsai M (1995) Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes & Dev* 9:1009-1019.
- Naya F, Huang H-P, Qiu Y, Mutoh H, DeMayo F, Leiter A, Tsai M-J (1997) Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes & Dev* 11:2323-2334.
- Nickerson Poulin A, Guerci A, El Mestikawy S, Semba K (2006) Vesicular glutamate transporter 3 immunoreactivity is present in cholinergic basal forebrain neurons projecting to the basolateral amygdala in rat. *J Comp Neurol* 498:690-711.
- Nieto M, Schuurmans C, Britz O, Guillemot F (2001) Neural bHLH genes control the neuronal versus glial fate decision in cortical progenitors. *Neuron* 29:401-413.
- Norton JD (2000) ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113 (Pt 22):3897-3905.
- Novitsch BG, Chen AI, Jessell TM (2001) Coordinate regulation of motor neuron subtype identity and pan-neuronal properties by the bHLH repressor Olig2. *Neuron* 31:773-789.
- Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB, Bell GW, Rinaldi NJ, Murray HL, Volkert TL, Schreiber J, Rolfe PA, Gifford DK, et al. (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* 303:1378-1381.
- Ohnuma S, Harris WA (2003) Neurogenesis and the cell cycle. *Neuron* 40:199-208.
- Ohsako S, Hyer J, Panganiban G, Oliver I, Caudy M (1994) Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of *Drosophila* sensory organ formation. *Genes Dev* 8:2743-2755.
- Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R (1999) Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *Embo J* 18:2196-2207.
- Ohtsuka T, Sakamoto M, Guillemot F, Kageyama R (2001) Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem* 276:30467-30474.

- Ohuchida K, Mizumoto K, Ishikawa N, Fujii K, Konomi H, Nagai E, Yamaguchi K, Tsuneyoshi M, Tanaka M (2005) The role of S100A6 in pancreatic cancer development and its clinical implication as a diagnostic marker and therapeutic target. *Clin Cancer Res* 11:7785-7793.
- Okajima T, Irvine KD (2002) Regulation of notch signaling by o-linked fucose. *Cell* 111:893-904.
- Okano T, Sasaki M, Fukada Y (2001) Cloning of mouse BMAL2 and its daily expression profile in the suprachiasmatic nucleus: a remarkable acceleration of Bmal2 sequence divergence after Bmal gene duplication. *Neurosci Lett* 300:111-114.
- Ooe N, Saito K, Mikami N, Nakatuka I, Kaneko H (2004) Identification of a novel basic helix-loop-helix-PAS factor, NXF, reveals a Sim2 competitive, positive regulatory role in dendritic-cytoskeleton modulator drebrin gene expression. *Mol Cell Biol* 24:608-616.
- Orentas DM, Hayes JE, Dyer KL, Miller RH (1999) Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Development* 126:2419-2429.
- Otonkoski T, Mally MI, Hayek A (1994) Opposite effects of beta-cell differentiation and growth on reg expression in human fetal pancreatic cells. *Diabetes* 43:1164-1166.
- Otonkoski T, Ustinov J, Rasilainen S, Kallio E, Korsgren O, Hayry P (1999) Differentiation and maturation of porcine fetal islet cells in vitro and after transplantation. *Transplantation* 68:1674-1683.
- Owen K, Hattersley AT (2001) Maturity-onset diabetes of the young: from clinical description to molecular genetic characterization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15:309-323.
- Panda S, Hogenesch JB, Kay SA (2002) Circadian rhythms from flies to human. *Nature* 417:329-335.
- Panin VM, Shao L, Lei L, Moloney DJ, Irvine KD, Haltiwanger RS (2002) Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. *J Biol Chem* 277:29945-29952.
- Park HC, Mehta A, Richardson JS, Appel B (2002) olig2 is required for zebrafish primary motor neuron and oligodendrocyte development. *Dev Biol* 248:356-368.
- Parras CM, Schuurmans C, Scardigli R, Kim J, Anderson DJ, Guillemot F (2002) Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity. *Genes Dev* 16:324-338.
- Percival AC, Slack JM (1999) Analysis of pancreatic development using a cell lineage label. *Exp Cell Res* 247:123-132.
- Peyrefitte S, Kahn D, Haenlin M (2001) New members of the Drosophila Myc transcription factor subfamily revealed by a genome-wide examination for basic helix-loop-helix genes. *Mech Dev* 104:99-104.
- Peyton M, Stellrecht CM, Naya FJ, Huang HP, Samora PJ, Tsai MJ (1996) BETA3, a novel helix-loop-helix protein, can act as a negative regulator of BETA2 and MyoD-responsive genes. *Mol Cell Biol* 16:626-633.
- Pictet RL, Clark WR, Williams RH, Rutter WJ (1972) An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. *Dev Biol* 29:436-467.
- Poh A, Karunaratne A, Kolle G, Huang N, Smith E, Starkey J, Wen D, Wilson I, Yamada T, Hargrave M (2002) Patterning of the vertebrate ventral spinal cord. *Int J Dev Biol* 46:597-608.
- Polak M, Bouchareb-Banaei L, Scharfmann R, Czernichow P (2000) Early pattern of differentiation in the human pancreas. *Diabetes* 49:225-232.
- Poll AV, Pierreux CE, Lokmane L, Haumaitre C, Achouri Y, Jacquemin P, Rousseau GG, Cereghini S, Lemaigre FP (2006) A vHNF1/TCF2-HNF6 cascade regulates the transcription factor network that controls generation of pancreatic precursor cells. *Diabetes* 55:61-69.
- Portin P (2002) General outlines of the molecular genetics of the Notch signalling pathway in Drosophila melanogaster: a review. *Hereditas* 136:89-96.
- Poulson DF (1937) Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of Drosophila Melanogaster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 23:133-137.

- Qi Y, Cai J, Wu Y, Wu R, Lee J, Fu H, Rao M, Sussel L, Rubenstein J, Qiu M (2001) Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* 128:2723-2733.
- Ramain P, Khechumian R, Khechumian K, Arbogast N, Ackermann C, Heitzler P (2000) Interactions between chip and the achaete/scute-daughterless heterodimers are required for pannier-driven proneural patterning. *Mol Cell* 6:781-790.
- Ravassard P, Chatail F, Mallet J, Icard-Liepkalns C (1997a) 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.
- Ravassard P, Chatail F, Mallet J, Icard-Liepkalns C (1997b) 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.
- Ravassard P, Icard-Liepkalns C, Mallet J, Dumas Milne Edwards JB (1997c) cDNA libraries from a low amount of cells. *Methods Mol Biol* 67:317-329.
- Ravassard P, Vallin J, Mallet J, Icard-Liepkalns C (1997d) Relax promotes ectopic neuronal differentiation in *Xenopus* embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8602-8605.
- Ravassard P, Icard-Liepkalns C, Mallet J, Edwards JB (2003) cDNA libraries from a low amount of cells. *Methods Mol Biol* 226:499-510.
- Raverot G, Weiss J, Park SY, Hurley L, Jameson JL (2005) Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Dev Biol* 283:215-225.
- Rawdon BB, Kramer B, Andrew A (1984) The distribution of endocrine cell progenitors in the gut of chick embryos. *J Embryol Exp Morphol* 82:131-145.
- Rawdon BB, Andrew A (1988) Can proventricular mesenchyme promote differentiation of endocrine cells in gizzard endoderm? *Cell Differ Dev* 25:135-143.
- Rebeiz M, Stone T, Posakony JW (2005) An ancient transcriptional regulatory linkage. *Dev Biol* 281:299-308.
- Richardson WD, Smith HK, Sun T, Pringle NP, Hall A, Woodruff R (2000) Oligodendrocyte lineage and the motor neuron connection. *Glia* 29:136-142.
- Robinson KA, Lopes JM (2000) SURVEY AND SUMMARY: *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nucleic Acids Res* 28:1499-1505.
- Rodriguez I, Hernandez R, Modolell J, Ruiz-Gomez M (1990) Competence to develop sensory organs is temporally and spatially regulated in *Drosophila* epidermal primordia. *Embo J* 9:3583-3592.
- Roegiers F, Jan YN (2004) Asymmetric cell division. *Curr Opin Cell Biol* 16:195-205.
- Rossant J, Guillemot F, Tanaka M, Latham K, Gertenstein M, Nagy A (1998) Mash2 is expressed in oogenesis and preimplantation development but is not required for blastocyst formation. *Mech Dev* 73:183-191.
- Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, et al. (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33:401-406.
- Ruiz i Altaba A (1998) Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* 125:2203-2212.
- Ruvkun G, Hobert O (1998) The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 282:2033-2041.
- Ruzinova MB, Benezra R (2003) Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 13:410-418.
- Sabate O, Barkats M, Buc-Caron MH, Castel-Barthe MN, Finiels F, Horellou P, Revah F, Mallet J (1995a) Adenovirus for neurodegenerative diseases: in vivo strategies and ex vivo gene therapy using human neural progenitors. *Clin Neurosci* 3:317-321.

- Sabate O, Horellou P, Vigne E, Colin P, Perricaudet M, Buc-Caron MH, Mallet J (1995b) Transplantation to the rat brain of human neural progenitors that were genetically modified using adenoviruses. *Nat Genet* 9:256-260.
- Sagne C, Agulhon C, Ravassard P, Darmon M, Hamon M, El Mestikawy S, Gasnier B, Giros B (2001) Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7206-7211.
- Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D (2000) Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* 2:404-414.
- Sanchez-Capelo A, Corti O, Mallet J (1999) Adenovirus-mediated over-expression of TGFbeta1 in the striatum decreases dopaminergic cell survival in embryonic nigral grafts. *Neuroreport* 10:2169-2173.
- Sarkis C, Serguera C, Petres S, Buchet D, Ridet JL, Edelman L, Mallet J (2000) Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14638-14643.
- Sarkis C (2001) Développement et amélioration de vecteurs viraux (baculovirus et lentivirus) et cellulaires (astocytes humain adultes) pour le transfert de gène dans le système nerveux central. In, p 239. France: Université Paris 6.
- Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S (1992) Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes Dev* 6:2620-2634.
- Sasamura T, Sasaki N, Miyashita F, Nakao S, Ishikawa HO, Ito M, Kitagawa M, Harigaya K, Spana E, Bilder D, et al. (2003) neurotic, a novel maternal neurogenic gene, encodes an O-fucosyltransferase that is essential for Notch-Delta interactions. *Development* 130:4785-4795.
- Satow T, Bae SK, Inoue T, Inoue C, Miyoshi G, Tomita K, Bessho Y, Hashimoto N, Kageyama R (2001) The basic helix-loop-helix gene *hesr2* promotes gliogenesis in mouse retina. *J Neurosci* 21:1265-1273.
- Sauvageot CM, Stiles CD (2002) Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 12:244-249.
- Sauve S, Tremblay L, Lavigne P (2004) The NMR solution structure of a mutant of the Max b/HLH/LZ free of DNA: insights into the specific and reversible DNA binding mechanism of dimeric transcription factors. *J Mol Biol* 342:813-832.
- Scardigli R, Schuurmans C, Gradwohl G, Guillemot F (2001) Crossregulation between Neurogenin2 and pathways specifying neuronal identity in the spinal cord. *Neuron* 31:203-217.
- Schonhoff S, Baggio L, Ratineau C, Ray SK, Lindner J, Magnuson MA, Drucker DJ, Leiter AB (2005) Energy homeostasis and gastrointestinal endocrine differentiation do not require the anorectic hormone peptide YY. *Mol Cell Biol* 25:4189-4199.
- Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB (2004) Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types. *Dev Biol* 270:443-454.
- Schuurmans C, Guillemot F (2002) Molecular mechanisms underlying cell fate specification in the developing telencephalon. *Curr Opin Neurobiol* 12:26-34.
- Schuurmans C, Armant O, Nieto M, Stenman JM, Britz O, Klenin N, Brown C, Langevin LM, Seibt J, Tang H, et al. (2004) Sequential phases of cortical specification involve Neurogenin-dependent and -independent pathways. *Embo J* 23:2892-2902.
- Schweisguth F (2004) Notch signaling activity. *Curr Biol* 14:R129-138.
- Schwitzgebel VM, Scheel DW, Connors JR, Kalamaras J, Lee JE, Anderson DJ, Sussel L, Johnson JD, German MS (2000) Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development* 127:3533-3542.
- Segev E, Halachmi N, Salzberg A, Ben-Arie N (2001) *Nato3* is an evolutionarily conserved bHLH transcription factor expressed in the CNS of Drosophila and mouse. *Mech Dev* 106:197-202.

- Shi S, Stanley P (2003) Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5234-5239.
- Shimizu C, Akazawa C, Nakanishi S, Kageyama R (1995) MATH-2, a mammalian helix-loop-helix factor structurally related to the product of *Drosophila* proneural gene *atonal*, is specifically expressed in the nervous system. *Eur J Biochem* 229:239-248.
- Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, Haslam SZ, Bronson RT, Elledge SJ, Weinberg RA (1995) Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 82:621-630.
- Simmons AD, Horton S, Abney AL, Johnson JE (2001) Neurogenin2 expression in ventral and dorsal spinal neural tube progenitor cells is regulated by distinct enhancers. *Dev Biol* 229:327-339.
- Slack J (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* 121:1569-1580.
- Smith SB, Gasa R, Watada H, Wang J, Griffen SC, German MS (2003) Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4. *J Biol Chem* 278:38254-38259.
- Smith SB, Watada H, German MS (2004) Neurogenin3 activates the islet differentiation program while repressing its own expression. *Mol Endocrinol* 18:142-149.
- Sommer L, Shah N, Rao M, Anderson DJ (1995) The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis. *Neuron* 15:1245-1258.
- Sommer L, Ma Q, Anderson D (1996a) Neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing PNS and CNS. *Mol Cell Neurosci* 8:221-241.
- Sommer L, Ma Q, Anderson DJ (1996b) neurogenins, a novel family of atonal-related bHLH transcription factors, are putative mammalian neuronal determination genes that reveal progenitor cell heterogeneity in the developing CNS and PNS. *Mol Cell Neurosci* 8:221-241.
- Soria B (2001) In-vitro differentiation of pancreatic beta-cells. *Differentiation* 68:205-219.
- Soula C, Danesin C, Kan P, Grob M, Poncet C, Cochard P (2001) Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism. *Development* 128:1369-1379.
- Stern MM (1954) Observations on the effect of electroshock therapy in two neurological cases. *J Nerv Ment Dis* 120:285-286.
- Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, et al. (2003) Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *Rna* 9:493-501.
- Stoffers DA, Heller RS, Miller CP, Habener JF (1999) Developmental expression of the homeodomain protein IDX-1 in mice transgenic for an IDX-1 promoter/lacZ transcriptional reporter. *Endocrinology* 140:5374-5381.
- Struhl G, Greenwald I (1999) Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398:522-525.
- Sun T, Pringle NP, Hardy AP, Richardson WD, Smith HK (1998) Pax6 influences the time and site of origin of glial precursors in the ventral neural tube. *Mol Cell Neurosci* 12:228-239.
- Sun T, Echelard Y, Lu R, Yuk DI, Kaing S, Stiles CD, Rowitch DH (2001) Olig bHLH proteins interact with homeodomain proteins to regulate cell fate acquisition in progenitors of the ventral neural tube. *Curr Biol* 11:1413-1420.
- Taghert PH, Doe CQ, Goodman CS (1984) Cell determination and regulation during development of neuroblasts and neurones in grasshopper embryo. *Nature* 307:163-165.
- Takebayashi H, Yoshida S, Sugimori M, Kosako H, Kominami R, Nakafuku M, Nabeshima Y (2000) Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in

- neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3. *Mech Dev* 99:143-148.
- Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K, 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.
- Takebayashi K, Takahashi S, Yokota C, Tsuda H, Nakanishi S, Asashima M, Kageyama R (1997) Conversion of ectoderm into a neural fate by ATH-3, a vertebrate basic helix-loop-helix gene homologous to *Drosophila* proneural gene atonal. *Embo J* 16:384-395.
- Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T (1995) Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). *Curr Biol* 5:1416-1423.
- Tanabe Y, Jessell TM (1996) Diversity and pattern in the developing spinal cord. *Science* 274:1115-1123.
- Tanaka M, Gertsenstein M, Rossant J, Nagy A (1997) Mash2 acts cell autonomously in mouse spongiotrophoblast development. *Dev Biol* 190:55-65.
- Temple S (2001) Stem cell plasticity--building the brain of our dreams. *Nat Rev Neurosci* 2:513-520.
- The *C.elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282:2012-2018.
- Thomas M, Northrup SR, Hornsby PJ (1997) Adrenocortical tissue formed by transplantation of normal clones of bovine adrenocortical cells in scid mice replaces the essential functions of the animals' adrenal glands. *Nat Med* 3:978-983.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (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.
- Tomita K, Moriyoshi K, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R (2000) Mammalian achaete-scute and atonal homologs regulate neuronal versus glial fate determination in the central nervous system. *Embo J* 19:5460-5472.
- Torii M, Matsuzaki F, Osumi N, Kaibuchi K, Nakamura S, Casarosa S, Guillemot F, Nakafuku M (1999) Transcription factors Mash-1 and Prox-1 delineate early steps in differentiation of neural stem cells in the developing central nervous system. *Development* 126:443-456.
- Trocme C, Ravassard P, Sassone-Corsi P, Mallet J, Biguet NF (2001) CREM and ICER are differentially implicated in trans-synaptic induction of tyrosine hydroxylase gene expression in adrenal medulla and sympathetic ganglia of rat. *J Neurosci Res* 65:91-99.
- Tsutsumida H, Swanson BJ, Singh PK, Caffrey TC, Kitajima S, Goto M, Yonezawa S, Hollingsworth MA (2006) RNA interference suppression of MUC1 reduces the growth rate and metastatic phenotype of human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 12:2976-2987.
- Turner DL, Cepko CL (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328:131-136.
- Turner DL, Weintraub H (1994) Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* 8:1434-1447.
- Vaessin H, Caudy M, Bier E, Jan LY, Jan YN (1990) Role of helix-loop-helix proteins in *Drosophila* neurogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 55:239-245.
- Van Doren M, Bailey AM, Esnayra J, Ede K, Posakony JW (1994) Negative regulation of proneural gene activity: hairy is a direct transcriptional repressor of achaete. *Genes Dev* 8:2729-2742.
- Venter JC, Adams MD, Sutton GG, Kerlavage AR, Smith HO, Hunkapiller M (1998) Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 280:1540-1542.
- Verma-Kurvari S, Savage T, Gowan K, Johnson JE (1996) Lineage-specific regulation of the neural differentiation gene MASH1. *Dev Biol* 180:605-617.

- Verma-Kurvari S, Savage T, Smith D, Johnson JE (1998) Multiple elements regulate Mash1 expression in the developing CNS. *Dev Biol* 197:106-116.
- Vernon AE, Philpott A (2003) The developmental expression of cell cycle regulators in *Xenopus laevis*. *Gene Expr Patterns* 3:179-192.
- Verzi MP, Anderson JP, Dodou E, Kelly KK, Greene SB, North BJ, Cripps RM, Black BL (2002) N-twist, an evolutionarily conserved bHLH protein expressed in the developing CNS, functions as a transcriptional inhibitor. *Dev Biol* 249:174-190.
- Villares R, Cabrera CV (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.
- Vogel R, Amar L, Thi AD, Saillour P, Mallet J (2004) A single lentivirus vector mediates doxycycline-regulated expression of transgenes in the brain. *Hum Gene Ther* 15:157-165.
- Vojtek AB, Taylor J, DeRuiter SL, Yu JY, Figueroa C, Kwok RP, Turner DL (2003) Akt regulates basic helix-loop-helix transcription factor-coactivator complex formation and activity during neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 23:4417-4427.
- Voronova A, Baltimore D (1990) Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4722-4726.
- Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH (1995) Identification of optimized target sequences for the GLI3 zinc finger protein. *DNA Cell Biol* 14:629-634.
- Wallace K, Liu TH, Vaessin H (2000) The pan-neural bHLH proteins DEADPAN and ASENSE regulate mitotic activity and cdk inhibitor dacapo expression in the *Drosophila* larval optic lobes. *Genesis* 26:77-85.
- Walsh C, Cepko CL (1992) Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* 255:434-440.
- Wang L, Coffinier C, Thomas MK, Gresh L, Eddu G, Manor T, Levitsky LL, Yaniv M, Rhoads DB (2004) Selective deletion of the Hnf1beta (MODY5) gene in beta-cells leads to altered gene expression and defective insulin release. *Endocrinology* 145:3941-3949.
- Wang MM, Reed RR (1993) Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast. *Nature* 364:121-126.
- Wang X, Chu LT, He J, Emelyanov A, Korzh V, Gong Z (2001) A novel zebrafish bHLH gene, neurogenin3, is expressed in the hypothalamus. *Gene* 275:47-55.
- Wells JM, Melton DA (1999) Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:393-410.
- Wells JM, Melton DA (2000) Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 127:1563-1572.
- Wells JM (2003) Genes expressed in the developing endocrine pancreas and their importance for stem cell and diabetes research. *Diabetes Metab Res Rev* 19:191-201.
- Wessels N, Cohen J (1967) Early pancreas organogenesis: morphogenesis, tissue interactions, and mass effects. *Dev Biol* 15:237-270.
- Wettstein DA, Turner DL, Kintner C (1997) The *Xenopus* homolog of *Drosophila* Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis. *Development* 124:693-702.
- Wianny F, Real FX, Mummery CL, Van Rooijen M, Lahti J, Samarut J, 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.
- Wilson L, Maden M (2005) The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* 282:1-13.
- Wilson SI, Edlund T (2001) Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat Neurosci* 4 Suppl:1161-1168.

- Woods C, Montcouquiol M, Kelley MW (2004) Math1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nat Neurosci* 7:1310-1318.
- Wu L, Aster JC, Blacklow SC, Lake R, Artavanis-Tsakonas S, Griffin JD (2000) MAML1, a human homologue of *Drosophila* mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. *Nat Genet* 26:484-489.
- Yamagata K (2003) Regulation of pancreatic beta-cell function by the HNF transcription network: lessons from maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Endocr J* 50:491-499.
- Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY (2001) Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 294:2155-2158.
- Yasunami M, Suzuki K, Maruyama H, Kawakami H, Nagai Y, Hagiwara M, Ohkubo H (1996) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a novel basic helix-loop-helix protein structurally related to Neuro-D/BHF1. *Biochem Biophys Res Commun* 220:754-758.
- Yee SP, Rigby PW (1993) The regulation of myogenin gene expression during the embryonic development of the mouse. *Genes Dev* 7:1277-1289.
- Yokomine T, Shirohzu H, Purbowasito W, Toyoda A, Iwama H, Ikeo K, Hori T, Mizuno S, Tsudzuki M, Matsuda Y, et al. (2005) Structural and functional analysis of a 0.5-Mb chicken region orthologous to the imprinted mammalian *Ascl2/Mash2-Igf2-H19* region. *Genome Res* 15:154-165.
- Yoon K, Gaiano N (2005) Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nat Neurosci* 8:709-715.
- Yoon SO, Chikaraishi DM (1992) Tissue-specific transcription of the rat tyrosine hydroxylase gene requires synergy between an AP-1 motif and an overlapping E box-containing dyad. *Neuron* 9:55-67.
- Yoshida S, Ohbo K, Takakura A, Takebayashi H, Okada T, Abe K, Nabeshima Y (2001) Sgn1, a basic helix-loop-helix transcription factor delineates the salivary gland duct cell lineage in mice. *Dev Biol* 240:517-530.
- Yoshida S, Takakura A, Ohbo K, Abe K, Wakabayashi J, Yamamoto M, Suda T, Nabeshima Y (2004) Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev Biol* 269:447-458.
- Yun JJ, Heisler LE, Hwang, II, Wilkins O, Lau SK, Hyrcza M, Jayabalasingham B, Jin J, McLaurin J, Tsao MS, et al. (2006) Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 34:e85.
- Zahn S, Hecksher-Sorensen J, Pedersen IL, Serup P, Madsen O (2004) Generation of monoclonal antibodies against mouse neurogenin 3: a new immunocytochemical tool to study the pancreatic endocrine progenitor cell. *Hybrid Hybridomics* 23:385-388.
- Zennou V, Serguera C, Sarkis C, Colin P, Perret E, Mallet J, Charneau P (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 19:446-450.
- Zhou Q, Wang S, Anderson DJ (2000) Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron* 25:331-343.
- Zhou Q, Choi G, Anderson DJ (2001) The bHLH transcription factor Olig2 promotes oligodendrocyte differentiation in collaboration with Nkx2.2. *Neuron* 31:791-807.
- Zhou Q, Anderson DJ (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109:61-73.
- Zimmerman K, Shih J, Bars J, Collazo A, Anderson DJ (1993) XASH-3, a novel *Xenopus* achaete-scute homolog, provides an early marker of planar neural induction and position along the mediolateral axis of the neural plate. *Development* 119:221-232.
- zur Lage PI, Powell LM, Prentice DR, McLaughlin P, Jarman AP (2004) EGF receptor signaling triggers recruitment of *Drosophila* sense organ precursors by stimulating proneural gene autoregulation. *Dev Cell* 7:687-696.

RESUME

Relax chez le rat ou Neurogénine 3 (ngn3) chez la souris est un facteur de transcription de la famille basique Hélice Boucle Hélice (bHLH). Le profil d'expression de ce gène au cours du développement embryonnaire indique qu'il pourrait jouer un rôle fondamental dans la détermination du devenir nerveux ou endocrine des précurseurs neuronaux et pancréatiques respectivement.

Le premier objectif de mon projet vise à élucider, les mécanismes moléculaires permettant de rendre compte de la mise en place et du contrôle de l'expression tissulaire restreinte du gène ngn3. Cette étude réalisée par transgénèse, a été possible grâce à l'installation au laboratoire d'une plate-forme de transgénèse, qui m'a permis de générer des modèles de souris transgéniques de façon autonome. J'ai donc réalisé différentes constructions permettant d'exprimer le gène β -galactosidase sous le contrôle d'éléments potentiellement « enhancer » du promoteur *Ngn3*. J'ai caractérisé un élément de 3,85kb permettant de diriger l'expression du gène rapporteur exclusivement dans les territoires d'expression du gène endogène ngn3. L'étude de fragments plus restreints se poursuit actuellement mais nous disposons l'un fragment de 2,2kb dirigeant en transgénèse l'expression du gène LacZ dans l'hypothalamus ventral et les épithéliums pancréatiques et intestinaux.

Le second objectif de thèse est d'obtenir un marquage *in vivo*, par transfert de gène, de la population des cellules souches du pancréas endocrine exprimant ngn3 dans des explants de pancréas embryonnaires murins puis humains. En effet, nous disposons d'un système *in vivo* unique capable de récapituler le développement du pancréas endocrine par xénogreffe d'ébauches pancréatiques. J'ai démontré, dans ce modèle expérimental, la capacité de lentivirus recombinants à infecter efficacement des cellules progénitrices du pancréas, en ciblant à l'aide de promoteurs spécifiques l'expression du gène rapporteur dans les différentes populations cellulaires qui se sont différenciées. La construction et la production d'un vecteur lentiviral assurant l'expression du gène rapporteur de la GFP (Green Fluorescent protein) sous le contrôle de l'élément de 2,2kb du promoteur du gène ngn3, permettent actuellement de transduire des explants de pancréas embryonnaires murins. La transposition de ces modèles à du tissu embryonnaire humain est actuellement validée. Ce travail nous donne accès, chez l'homme, au réservoir des cellules souches du pancréas endocrine. L'amplification et la sélection de telles cellules souches constituent un défi majeur pour le développement de nouvelles thérapies du diabète de type I.

La fonction proendocrine de ngn3 étant déjà clairement établie au niveau du pancréas, le troisième objectif consiste à démontrer la fonction de détermination neuronale de ce facteur dans la moelle épinière. Dans le cadre d'une fonction de détermination, l'absence de différenciation d'une population de neurones est attendue suite à l'inactivation du gène ngn3. Nous avons pu démontrer que la mutation nulle ngn3 induit l'expression ectopique du facteur de détermination Mash1 dans la région ventrale de la moelle épinière exprimant normalement ngn3, assurant ainsi, une compensation fonctionnelle. Afin d'appréhender directement la fonction de détermination de ngn3 et cela en absence de compensation, nous avons généré des souris doubles mutant nulles Mash1-Ngn3. L'analyse phénotypique des mutants perte de fonction ngn3 et Mash1/ngn3 dans la moelle épinière ventrale nous a permis de démontrer la fonction de ngn3 dans la détermination du devenir neuronal. De plus nous avons, pour la première fois, établi que les neurones matures dont la différenciation est déterminée par ngn3 présentent un phénotype glutamatergique.

Mots clés : Ngn3, bHLH, expression tissu-spécifique, régions régulatrices, embryons transgéniques et fondateurs, ciblage progéniteurs/souches, transfert de gène, fonctions proneurale et proendocrine